

Mikrogliaknötchen und diffuse Aktivierung von Mikroglia im Rahmen der Sepsis

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Renata Krämer
geboren am 02.02.1990 in Ilmenau

Gutachter

- 1. PD Dr. Bernd Romeike, Jena**
- 2. Prof. Dr. Hubertus Axer, Jena**
- 3. Prof. Dr. Christian Hagel, Hamburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Sepsis.....	3
2.1.1 Geschichte und Definitionen der Sepsis.....	3
2.1.2 Inzidenz und Epidemiologie der Sepsis	4
2.1.3 Pathophysiologie der Sepsis	4
2.1.4 Klinische Diagnostik der Sepsis.....	6
2.1.5 Therapie der Sepsis	7
2.1.6 Allgemeinpathologische Befunde	7
2.2 Manifestation der Sepsis im ZNS	8
2.2.1 Die septische Herdenzephalitis	8
2.2.2 Die septische Enzephalopathie.....	11
2.2.3 Neuropathologische Befunde	16
2.3 Mikroglia.....	18
2.3.1 Definition und Ursprung	18
2.3.2 Funktion und morphologische Zustände	19
2.3.3 Rolle der Mikroglia bei Inflammation	20
2.3.4 Immunphänotypisierung von Mikroglia.....	22
3 Ziele der Arbeit.....	24
4 Material und Methoden	25
4.1 Material	25
4.2 Methoden	27
4.2.1 Auswahl von Patienten und Kontrollen	27
4.2.2 Herstellung der Präparate	27
4.2.3 Histochemische und immunhistochemische Färbungen	27
4.2.3.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin	27
4.2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Mikroglia	28
4.2.4 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.....	32
4.2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	32
4.2.6 Statistische Analyse.....	34

5 Ergebnisse.....	35
5.1 Patientenkollektiv	35
5.2 Korrelation der Mikroglia Knötchen mit klinischen und autoptischen Befunden	37
5.2.1 Mikroglia Knötchen und klinischer Verdacht auf Sepsis	37
5.2.2 Mikroglia Knötchen und autoptischer Verdacht auf Sepsis	37
5.2.3 Klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis	38
5.2.4 Mikroglia Knötchen und klinischer sowie autoptischer Verdacht auf Sepsis	39
5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen	41
5.4 Immunhistochemische Färbungen	43
5.4.1 Mikroglia Knötchen innerhalb der Medulla oblongata	43
5.4.2 Zelldichte immunpositiver Mikroglia in der Medulla oblongata	46
5.4.2.1 Mikroglia dichte in Mikroglia- und Kontrollgruppe	46
5.4.2.2 Mikroglia dichte bei klinischem Verdacht auf Sepsis	48
5.4.2.3 Mikroglia dichte bei autoptischem Verdacht auf Sepsis	49
5.4.2.4 Mikroglia dichte bei neuropathologischem, klinischem und autoptischem Verdacht auf Sepsis	50
5.4.3 Zelldichte ramifizierter und amoeboider Mikroglia	51
5.4.4 Mikroglia dichte in unterschiedlichen Regionen der Medulla oblongata	55
5.4.5 Korrelation der Mikroglia dichte zwischen den Regionen	59
5.4.6 Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Mikroglia dichte	60
5.4.6.1 Einfluss des Alters auf die Mikroglia dichte	60
5.4.6.2 Einfluss des Geschlechts auf die Mikroglia dichte	62
5.4.7 Einfluss von Begleiterkrankungen auf die Mikroglia dichte	63
5.4.7.1 Einfluss von Alzheimer auf die Mikroglia dichte	64
5.4.7.2 Einfluss der zerebralen Ischämie auf die Mikroglia dichte	66
6 Diskussion.....	68
6.1 Mikroglia Knötchen in der Routine-HE-Färbung	68
6.1.1 Medulla oblongata als Prädispositionsort für Mikroglia Knötchen	68
6.1.2 Das Auftreten von Mikroglia Knötchen bei klinischem und autoptischem Verdacht auf Sepsis	68
6.1.3 Einfluss der Schnittebene	70
6.2 Immunhistochemie	71
6.2.1 Immunhistochemische Darstellung von Mikroglia Knötchen	71
6.2.2 Immunhistochemische Darstellung diffuser aktivierter Mikroglia	73
6.2.2.1 Überlegenheit der morphometrischen Auswertung	73
6.2.2.2 Gesteigerte Mikroglia dichte bei Sepsis	74
6.2.2.3 Ramifizierte und amoeboide Mikroglia	75

6.2.2.4 Mikroglia-dichte in unterschiedlichen Regionen der Medulla oblongata.....	76
6.2.2.5 Abschließende Bewertung der Marker zur Darstellung diffuser aktivierter Mikroglia	78
6.3 Einfluss von Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen	79
6.3.1 Patientenalter und Geschlecht	79
6.3.2 Morbus Alzheimer.....	81
6.3.3 Zerebrale Ischämien	82
7 Schlussfolgerungen	83
8 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	85
9 Anhang.....	92
9.1 Ergänzungen	92
9.2 Tabellenverzeichnis	93
9.3 Abbildungsverzeichnis.....	94
9.4 Danksagung.....	97
9.5 Lebenslauf.....	98
9.6 Ehrenwörtliche Erklärung.....	100

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACCP/SCCM	American college of chest physicians and society of critical care medicine
AOI	Area of interest (Interessantes Gebiet)
CAM-ICU	Confusion assessment method for intensive care units
°C	Grad Celsius
CBF	Cerebral blood flow (zerebraler Blutfluss)
CCT	Craniale Computertomographie
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CSA	Catalyzed signal amplification
CT	Computertomographie
CVOs	Zirkumventrikuläre Organe
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DIC	Disseminierte intravasale Koagulation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GCS	Glasgow coma scale
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IBA-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1)
ICAM-1	Intracellular adhaesion molecule 1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1)
ICP	Intracranial pressure (intrakranieller Druck)

IFN	Interferon
IgA/G	Immunglobulin A/G
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LAM	Lysosome-associated membrane glycoprotein (Lysosomen-assoziierte Membranproteine)
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemotactic proteine 1 (Monozyten-chemotaktisches Protein 1)
min	Minute
mm ²	Quadratmillimeter
µm	Mikrometer
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
pH	Pondus Hydrogenii
PRES	Posteriors reversibles Enzephalopathiesyndrom
RASS	Richmond agitation sedation scale
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
sec	Sekunde
SEP	Somatosensorisch evozierte Potentiale
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TBST	Tris-buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TIA	Transistorische ischämische Attacke
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentralnervensystem

1 Zusammenfassung

Hintergrund Bislang existieren nur wenige Beschreibungen charakteristischer Hirnveränderungen und neuropathologischer Befunde im Rahmen der Sepsis. Eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der septischen Enzephalopathie wird jedoch der Zellpopulation der Mikroglia zugesprochen. Neben ihrer Stütz- und Haltefunktion im Nervengewebe sind sie als immunkompetente residente Makrophagen an einer Vielzahl pathologischer Prozesse im Zentralnervensystem (ZNS) beteiligt. So kommt es auch im Rahmen von Entzündungsprozessen zu einer Aktivierung von Mikroglia, was sowohl morphologische als auch immunphänotypische Veränderungen der Zellen zur Folge hat. Eine verstärkte diffuse Aktivierung konnte bereits bei Sepsispatienten mit Hilfe unterschiedlicher Methoden gezeigt werden, wobei jedoch bisher der ideale Marker zur Darstellung aktivierter Mikroglia fehlt. Darüber hinaus wird aktuell der Stellenwert von Mikrogliaknötchen als mögliches morphologisches Korrelat und frühes Anzeichen eines septischen Geschehens diskutiert.

Zielstellung Zunächst sollte im Rahmen der Arbeit die Hypothese geprüft werden, ob das Auftreten von Mikrogliaknötchen gehäuft mit dem Krankheitsbild einer Sepsis assoziiert ist und ob sich die Hirnregion der Medulla oblongata als Prädilektionsort für das Auftreten von Mikrogliaknötchen bestätigt. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden sollte außerdem das Auffinden von Mikrogliaknötchen erleichtert und die Häufigkeit im Vergleich zur Routine-HE-Färbung beurteilt werden. Darüber hinaus sollte mittels morphometrischer Verfahren untersucht werden, ob Patienten mit Mikrogliaknötchen zudem eine verstärkte diffuse Aktivierung von Mikroglia aufweisen und welcher Marker zur Darstellung diffuser aktivierter Mikroglia am besten geeignet ist. Letztlich sollte die Frage beantwortet werden, ob es im Rahmen eines septischen Geschehens zu charakteristischen Hirnveränderungen kommt, die sich für eine Klassifikation zur postmortalen Sepsisdiagnostik eignen.

Material und Methoden Im Zeitraum von 2007 bis 2012 wurden aus dem Dokumentationssystem des Instituts für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena alle Gehirne selektiert, bei denen in der HE-Färbung Mikrogliaknötchen nachweisbar waren. Daraufhin erfolgte eine Analyse der Lokalisation der Mikrogliaknötchen. In einer Fall-Kontroll-Studie wurde anschließend das Hirngewebe aus dem Bereich der Medulla oblongata von Patienten mit Mikrogliaknötchen mit Patienten ohne Mikrogliaknötchen verglichen. Alle Untersuchungen erfolgten an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Hirngewebe, welches im Rahmen von Autopsien entnommen wurde. Neben Routine-HE-Färbungen wurden die Mikroglia mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren über die Expression von

HLA-Klasse-II-Antigenen, CD68 und CD163 identifiziert. Es erfolgte sowohl eine Quantifizierung der Mikrogliaknötchen als auch eine Beurteilung der diffusen mikroglialen Aktivierung anhand einer morphometrisch ermittelten Zelldichte. Zusätzlich wurden klinische Angaben sowie Sektionsbefunde studiert, um die Assoziation der klinischen und autopsischen Befunde bezüglich einer Sepsis mit dem Auftreten von Mikrogliaknötchen zu untersuchen. Darüber hinaus wurden wichtige zentralnervöse Begleiterkrankungen erfasst und deren Einfluss auf die angewandten Untersuchungsmethoden untersucht.

Ergebnisse und Diskussion Bei etwa 6% aller Hirnsektionen konnten Mikrogliaknötchen nachgewiesen werden. Dabei waren fast 80% der Mikrogliaknötchen in der Medulla oblongata lokalisiert. Männer waren mit 65% häufiger betroffen als Frauen. Das Auftreten von Mikrogliaknötchen war in der Mehrheit der Fälle mit der klinischen Diagnose einer Sepsis assoziiert (Sensitivität: 68%, Spezifität: 88%). In Bezug auf die autopsischen Befunde zeigten sich eine vergleichbare Sensitivität (68%) und Spezifität (85%). In der Zusammenschau des Nachweises von Mikrogliaknötchen mit klinischen und autopsischen Hinweisen auf eine Sepsis ergab sich eine Übereinstimmungsrate von 70%. Zur Verbesserung der Konkordanz kamen immunhistochemische Methoden zum Einsatz. Diese dienten einerseits der Vereinfachung des Auffindens von Mikrogliaknötchen und andererseits zur Quantifizierung der mikroglialen Reaktion. Hierbei erwies sich HLA als geeignetster Marker zur Darstellung von Mikrogliaknötchen. Für die morphometrische Untersuchung der diffusen Mikroglia war hingegen CD68 besser geeignet. Die durchgeführten Untersuchungen waren letztlich unabhängig von Alter und Geschlecht sowie von zentralnervösen Begleiterkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer oder zerebralen Ischämien.

Schlussfolgerung Die vorliegende Arbeit demonstriert den Stellenwert von Mikrogliaknötchen und diffuser aktivierter Mikroglia im Rahmen der postmortalen Sepsisdiagnostik. Es konnte erstmals an einem größeren Patientenkollektiv gezeigt werden, dass das Auftreten von multiplen Mikrogliaknötchen als eine typische Hirnveränderung im Rahmen einer Sepsis angesehen werden kann. Das Auszählen von Mikrogliaknötchen stellt dabei im Vergleich zu morphometrischen Verfahren eine einfachere Methode zur Beurteilung einer Begleitreaktion im Rahmen eines septischen Geschehens im ZNS dar. Unter ökonomischen Gesichtspunkten scheint eine gezielte Untersuchung der Medulla oblongata auf das Vorliegen von Mikrogliaknötchen sinnvoll und kann zukünftig für den routinemäßigen Einsatz empfohlen werden. Obwohl sich HLA zur Darstellung der Mikrogliaknötchen und CD68 zur Identifizierung diffuser aktivierter Mikroglia als durchaus geeignete Marker erwiesen, wären spezifischere Marker zur Darstellung aktivierter Mikroglia wünschenswert.

2 Einleitung

2.1 Die Sepsis

2.1.1 Geschichte und Definitionen der Sepsis

Der Begriff der Sepsis leitet sich von dem griechischen Wort σήπω („faul machen“) ab und wurde bereits ca. 400 v. Chr. von Hippokrates eingeführt. Er postulierte, dass ausgehend von einer lokalen Verletzung durch Fäulnis der Gewebe und dadurch freigesetzte Gifte eine systemische Reaktion hervorgerufen werden kann. Diese Hypothese hatte bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts Bestand. Eine moderne Sicht entwickelte sich erst durch die Begründung der Mikrobiologie unter Robert Koch und den Arbeiten des französischen Chemikers Louis Pasteur. Dieser entdeckte um 1860, dass Fäulnis und Verwesung durch Mikroorganismen verursacht werden und vermutete, dass diese auch als Krankheitserreger wirken könnten. Basierend auf diesen Entdeckungen begründete der britische Chirurg Joseph Lister um 1870 die sogenannten antiseptischen Verfahren. In Deutschland wurde der Verständniswandel von Sepsis durch H. Lennartz und dessen Schüler Hugo Schottmüller (1867-1936) durchgesetzt, die den Grundstein für eine moderne Sepsisdefinition legten, indem sie einem Infektionsherd fundamentale Bedeutung zusprachen. (Kreymann und Wolf 1996)

Im Jahr 1989 beschäftigte sich der amerikanische Intensivmediziner R. C. Bone mit der Symptomatologie septischer Krankheitsbilder und veröffentlichte basierend auf diesen Daten 1991 eine neue Sepsisdefinition: "Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion" (Bone 1991). Auf der internationalen ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz im Jahr 1992 wurden daraufhin die vier separaten Schweregrade systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock unterschieden und einheitliche Definitionen sowie Diagnosekriterien festgelegt (vgl. Tabelle 23 im Anhang) (Bone et al. 1992). Während der SIRS auch erregerunabhängige pathologische Reize, wie Traumata oder Verbrennungen, zugrunde liegen können, bedingt die Diagnose der Sepsis zwangsläufig den Nachweis einer Infektion sowie das gleichzeitige Vorliegen von mindestens zwei unspezifischen Symptomen, wie Fieber, Tachykardie, Tachypnoe oder Leukozytose. Beim zusätzlichen Auftreten einer akuten, sekundär durch die Sepsis verursachten Organschädigung, spricht man von einer schweren Sepsis und bei zusätzlich starkem Abfall des Blutdrucks vom septischen Schock. (Bone et al. 1992) Aktuell wird Sepsis definiert als „die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und

ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (Werdan und Schuster 2005).

2.1.2 Inzidenz und Epidemiologie der Sepsis

Die Sepsis und ihr Folgen stellen weltweit eine große Herausforderung für die Medizin dar. Trotz aller Fortschritte und der Entwicklung neuer Medikamente, beträgt die Letalität immer noch 30-40% und ist damit die häufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen (Brun-Buisson et al. 1995). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Inzidenz der Sepsis und die Zahl der Sepsis-assoziierten Todesfälle weiter zunehmen. So ist in den USA im Verlauf von zwei Jahrzehnten die Inzidenz um 8,7%, d.h. auf etwa 300 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr gestiegen, wobei Männer häufiger betroffen sind (Martin et al. 2003). Demnach erkranken ca. 715.000 Menschen pro Jahr an einer Sepsis, von denen 215.000 Patienten versterben. Das entspricht einer Mortalität von 28,6%. Jährlich werden in den USA durch die Sepsis Kosten von rund 16,7 Milliarden Dollar verursacht. (Angus et al. 2001, Martin et al. 2003) In Deutschland geht man derzeit von einer Inzidenz von etwa 110-116 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr aus (Brunkhorst 2006). Demzufolge erkranken in Deutschland ca. 79.000 Menschen jährlich an einer Sepsis und 75.000 an einer schweren Sepsis. Studien haben gezeigt, dass Atemwegsinfektionen mit 63%, gefolgt von intraabdominalen Infektionen mit 25,3% dabei die häufigsten Infektionsquellen darstellen. Etwa jeder zweite Patient der an einer schweren Sepsis erkrankt, stirbt daran. Mit insgesamt 60.000 Todesfällen im Jahr stellen die septischen Erkrankungen somit die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt und malignen Tumorerkrankungen dar. Die direkten Kosten allein für die intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis belaufen sich dabei auf geschätzte 1,7 Milliarden Euro im Jahr. (Brun-Buisson et al. 1995, Brunkhorst 2006)

2.1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Anhand der Definition nach Werdan und Schuster wird deutlich, dass das Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort eine große Rolle bei der Genese der Sepsis spielt (Werdan und Schuster 2005). Besondere Bedeutung kommt dabei einer lokalen inflammatorischen Reaktion zu, welche viraler, bakterieller, fungaler oder auch parasitärer Natur sein kann. Prinzipiell sind alle Erreger in der Lage eine Sepsis auszulösen, wobei nicht nur Zahl, Pathogenität oder Virulenz des Erregers eine Rolle spielen, sondern vor allem auch das Ausmaß der Reaktion des Patienten. Es kommt zunächst zu einer Abwehrreaktion des

umliegenden biologisch aktiven Gewebes gegen den pathologischen Stimulus mit dem Versuch der Elimination. Bei Versagen dieser Mechanismen können jedoch in Folge einer unkontrollierten, überschießenden Reaktion auch körpereigene Zell- und Organsysteme geschädigt werden. Hierbei führt der Kontakt mit einem Fremdanigen zur Auslösung der sogenannten Inflammationskaskade. (Cohen 2002) Körpereigene immunkompetente Zellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen oder Lymphozyten sind in der Lage, bestimmte Strukturen der Pathogene, sogenannte Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), über zelleigene Pathogen-Recognition Receptors, wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs) oder Nod-like Rezeptoren, zu erkennen und können dadurch aktiviert werden. Bei den PAMPs kann es sich beispielsweise um das Lipopolysaccharid (LPS), als Endotoxin gramnegativer Bakterien, um Exotoxine grampositiver Bakterien oder auch um Zellwandbestandteile wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäure von Bakterien und Pilzen handeln. Durch die Bindung dieser Strukturen an die Rezeptoren der Abwehrzellen werden zahlreiche sowohl pro-inflammatorische Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6), als auch anti-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-4 , IL-10 und $\text{TGF-}\beta 1$) freigesetzt, die an den Zielzellen stimulatorische und toxische Wirkungen hervorrufen. Dabei stehen pro- und anti-inflammatorische Mechanismen in komplexer Interaktion miteinander und bestimmen das Ausmaß der entzündlichen Reaktion. (Dinarello 1997)

Die Todesursache der Sepsispatienten ist in der Regel das Multiorganversagen (Vincent et al. 2000). In der Pathogenese des Multiorganversagens spielen vor allem die verringerte Perfusion der Gewebe und die damit verbundene Hypoxie eine entscheidende Rolle. Histologisch kommt es bedingt durch Inflammationsmediatoren zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und damit zu einer Dilatation von Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Sauerstoffradikale und weitere zytotoxische Substanzen der Leukozyten führen zu einer Schädigung der Endothelzellen und es entsteht ein Kapillarleck, welches eine vermehrte Extravasation von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe zur Folge hat. Dabei gelangen auch Plasmaproteine und Leukozyten in den Entzündungsherd und der intravasale onkotische Druck sinkt. Diese Prozesse führen zu einer ausgeprägten arteriellen Hypotension als charakteristische Eigenschaft des septischen Schocks. Bedingt durch die massiven Flüssigkeitsverschiebungen steigt die Viskosität des Blutes und es kommt zu einer Aggregation der Erythrozyten und zur Störung der Mikrozirkulation. Des Weiteren wird durch die Beschädigung des Kapillarendothels und die daraufhin erfolgende Thrombozytenaggregation das intravasale Gerinnungssystem aktiviert und es kommt zur

Bildung von Mikrothromben. Diese sogenannte Verbrauchskoagulopathie führt zu Blutungen der inneren Organe und der Haut. (Gustot 2011, Landry und Oliver 2001)

Wenn der betroffene Organismus nicht in der Lage ist, eine Entzündung lokal zu begrenzen, kommt es zur Ausbreitung der Entzündungsreaktion und im weiteren Verlauf zu einer generalisierten systemischen Inflammationsreaktion, dem sogenannten Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Dabei ist nicht nur eine überschießende Immunantwort von Bedeutung, sondern es zeigen sich auch Phasen einer Immunschwäche mit Spättyphypersensitivität, verminderter Expression antigenpräsentierender Zellen und erhöhter Prädisposition der Patienten gegenüber nosokomialer Infektionen. Dieses Wechselspiel zwischen Hyperinflammation und Immunsuppression ist durch die wechselseitige Dominanz pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) und schädigenden Sauerstoffradikalen (ROS) einerseits, sowie anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10 und TGF- β 1) andererseits bedingt. (Weigand et al. 2004)

2.1.4 Klinische Diagnostik der Sepsis

Die ersten Anzeichen einer Sepsis sind sehr variabel und werden durch zahlreiche Faktoren, wie Virulenz und Anzahl der Pathogene, Eintrittspforte der Keime sowie der Empfänglichkeit des Organismus gegenüber Erregern beeinflusst (Reinhart et al. 2010). Klinisch kann sich die Generalisierung der Entzündung durch systemische Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Verwirrtheit, Tachykardie oder Oligurie bemerkbar machen. Auch humorale Veränderungen wie Leukozytose, Erhöhung der Akute-Phase-Proteine, vor allem CRP und Fibrinogen, und eine Infektanämie sind typisch im Zusammenhang mit einer Entzündung (Bühling et al. 2004). Allerdings gibt es derzeit keinen Parameter, der allein zur Diagnose der Sepsis führen kann. Vielmehr ist es eine Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen, welche das Krankheitsbild einer Sepsis definieren (Reinhart et al. 2010). Demzufolge sollte eine umfangreiche Labordiagnostik mit Bestimmung von Entzündungs-, Hämodynamik- und Perfusionsparametern zur Beurteilung möglicher Organdysfunktionen durchgeführt werden. Für den Nachweis einer Infektion empfiehlt sich die Gewinnung von geeignetem Material für die mikrobiologische Untersuchung. Dabei kann es sich um Blutkulturen, Urinproben, Nativmaterial (Gewebe) oder Wundabstriche handeln. Auch bildgebende Verfahren können in bestimmten Fällen (z.B. Lungenentzündung) zur Diagnose herangezogen werden (Reinhart et al. 2010). Dennoch existiert für den Nachweis der Infektion weiterhin kein Goldstandard. In Abhängigkeit von der vorausgegangenen antibiotischen Behandlung, findet sich eine Bakteriämie nur bei ca.

30% aller Sepsispatienten (Bates et al. 1997) und in insgesamt 30% der Fälle sind die mikrobiologische Befunde negativ, obwohl eindeutige klinische Zeichen einer Infektion vorliegen (Alberti et al. 2002). Kritisch kranke Patienten weisen zudem häufig ein SIRS und multiple Organdysfunktionen auf, wobei der kausale Zusammenhang mit einer Infektion meist nicht sicher nachzuweisen ist. Als neuer Biomarker für eine frühere und verlässlichere Diagnose der Sepsis wird aktuell Procalcitonin diskutiert. Gegenüber anderen untersuchten Mediatoren und Molekülen, wie IL-6, IL-8 oder dem C-reaktiven Protein (CRP), scheint Procalcitonin eine höhere Sensitivität und Spezifität für die Sepsis aufzuweisen (Luzzani et al. 2003, Harbarth et al. 2001). In einer aktuellen Meta-Analyse konnte außerdem gezeigt werden, dass Procalcitonin effektiv zwischen einer Sepsis und einem nicht-infektiösen SIRS unterscheiden kann und somit ein hilfreicher Biomarker für die frühe Diagnose der Sepsis bei kritisch kranken Patienten darstellt (Wacker et al. 2013).

2.1.5 Therapie der Sepsis

Die Grundlage bildet die kausale Therapie, welche den Einsatz antimikrobieller Substanzen sowie eine operative Sanierung des Infektionsfokus beinhaltet (Reinhart et al. 2010). Dabei ist die Gabe von Antibiotika für die Behandlung der Sepsis unerlässlich, allerdings für die Ausheilung allein meist nicht ausreichend. Über eine verstärkte Freisetzung von bakteriellen Produkten kann unter Umständen sogar die Progression der Sepsis beschleunigt werden (Shenep und Mogan 1984). Bei adäquater Antibiotikatherapie wird jedoch die Letalität bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock deutlich gesenkt und die Komplikationsrate reduziert. Dabei ist vor allem der Zeitpunkt der Verabreichung entscheidend. Eine kalkulierte, intravenöse Therapie sollte auf begründeten Verdacht hin frühzeitig, d.h. innerhalb einer Stunde nach Diagnosestellung und Abnahme der Blutkulturen, begonnen werden. Weiterhin wird empfohlen das antimikrobielle Regime alle 48-72 Stunden anhand klinischer und mikrobiologischer Kriterien neu zu bewerten und die Therapiedauer auf maximal 7-10 Tage zu begrenzen. Neben der kausalen Therapie stellt die sogenannte supportive Therapie eine weitere Säule in der Sepsisbehandlung dar. Dabei spielen vor allem die hämodynamische Stabilisierung und das Atemwegsmanagement eine große Rolle. (Reinhart et al. 2010)

2.1.6 Allgemeinpathologische Befunde

Bisher existieren für die Sepsis keine streng pathognomonischen Befunde. Die morphologischen Charakteristika der Sepsis entstehen im Allgemeinen durch den Eintritt des Schocks mit dessen Endpunkt einer disseminierten intravasalen Koagulation (DIC), welche

die Organe morphologisch kennzeichnet. Dabei führt die DIC einerseits zur Ausbildung multipler Mikrothromben der Endstrombahn mit fortschreitender hypoxischer Schädigung des Gewebes und andererseits, durch den raschen Verbrauch von Gerinnungsfaktoren im Rahmen der Verbrauchskoagulopathie, zur Entwicklung einer hämorrhagischen Diathese. Die Blutungen sind dabei besonders an Haut, Schleimhäuten und der Serosa sichtbar. Wenn es zusätzlich zu einer embolischen Verschleppung der Erreger kommt, ist die Ausbildung sogenannter metastatisch-pyämischer Abszesse in allen Organen möglich. Als weitere typische Allgemeinbefunde im Rahmen der Sepsis gelten der rasche Eintritt von Fäulniserscheinungen, eine meist nur gering ausgebildete bzw. frühzeitig gelöste Totenstarre sowie die Ausbildung eines septischen Ikterus durch Leberschädigung und Hämolyse. Makroskopisch kann vor allem die Milz relativ charakteristische Veränderungen im Rahmen der Sepsis aufweisen. Zum einen kommt es zu einer starken Milzschwellung mit Verdoppelung des Gewichts auf ca. 300 g, zum anderen erscheint die Pulpa weich, aufgelockert und von zerfließlicher Konsistenz, was auf eine Hyperämie des Organs zurückzuführen ist. Außerdem ist die Anzahl der Granulozyten und Makrophagen erheblich erhöht. Die anderen parenchymatösen Organe sind vor allem durch Dystrophien, Nekrosen und Blutungen gekennzeichnet. Weiterhin ist eine generalisierte Schwellung der Lymphknoten mit fokalen Nekrosen typisch. (Bankl 2002, Thomas und Büttner 2003)

2.2 Manifestation der Sepsis im ZNS

Bei der Manifestation einer Sepsis im ZNS sind aus pathophysiologischer Sicht die septische Herdenzephalitis und die septische Enzephalopathie als eigene Entitäten voneinander abzugrenzen.

2.2.1 Die septische Herdenzephalitis

Definition und Epidemiologie

„Septische Herdenzephalitiden sind Krankheitsbilder, die sich auf dem Boden einer bakteriellen Sepsis entwickeln, aber eigenen pathogenetischen Gesetzmäßigkeiten folgen“ (Prange 2006). Dabei handelt es sich um keine primäre Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS), sondern um eine häufig auftretende Komplikation bei septischen Patienten in der Intensivmedizin als Folge einer Erregerstreuung (Sharshar et al. 2004). Aktuelle Studien zufolge treten septische Herdenzephalitiden weitaus häufiger auf, als sie diagnostiziert werden, da enzephalitische Symptome unter Umständen als psychoorganisches Durchgangssyndrom oder vorübergehende Verwirrtheit bei fieberhaften Erkrankungen fehlinterpretiert werden. Der Infektionsmodus bestimmt Pathogenese, klinische Symptomatik

und Krankheitsverlauf der septischen Enzephalitiden. Aus diesem Grund kann zwischen der septisch-embolischen und der septisch-metastatischen Herdenzephalitis unterschieden werden. (Prange 2006)

Pathogenese

Von einer septisch-embolischen Herdenzephalitis spricht man, wenn der ZNS-Befall durch einen bakterientragenden Embolus erfolgt. Dabei handelt es sich fast immer um die Komplikation einer bakteriellen Endokarditis im Bereich des linken Herzens, die überwiegend durch Staphylokokken oder β -hämolysierende Streptokokken hervorgerufen wird. Wenn sich bakterienreiche Fragmente der Klappenvegetationen lösen, können diese über den Blutstrom ins Gehirn verschleppt werden und zur Verlegung von Hirnarterien führen. Sind eloquente Hirnareale betroffen, kommt es über eine ischämische Infarzierung zur typischen Schlaganfallssymptomatik. Im Bereich des Gefäßverschlusses befallen im weiteren Verlauf Keime die Gefäßwand und induzieren eine pyogene Arteriolitis mit Destruktion elastischer Strukturen. Eine spontane Lyse des Embolus kann lokale Einblutungen in das Hirnparenchym zur Folge haben. (Ferro 2003, Masuda et al. 1992)

Von einer septisch-metastatischen Herdenzephalitis ist hingegen die Rede, wenn eine Erregerstreuung ohne gleichzeitige Embolie eintritt. Bei den Erregern sind neben den vorherrschenden Staphylokokken und Streptokokken auch Enterobakterien, Pilze und Chlamydien von Bedeutung, wobei häufiger eine bakterielle Mehrbesiedelung vorzuliegen scheint. Im Gegensatz zur septisch-embolischen Enzephalitis ist der primäre Infektionsherd sehr variabel und kann an einer beliebigen Stelle des Körpers liegen (Magen-Darm-Trakt, Herz, Lunge, etc.). Von diesem Herd ausgehend bilden sich Bakterienagglomerate, die in die Zirkulation und über den pulmonalen „Filter“ letztendlich ins Gehirn gelangen. Zu einer primären ischämischen Hirngewebsschädigung kommt es jedoch nicht, da zunächst keine thrombotischen Gefäßverschlüsse entstehen. (Prange 2006)

Klinik

Der Krankheitsverlauf einer septischen Herdenzephalitis ist in der Regel akut. Initial kommt es bei den Patienten meist zum Auftreten unspezifischer Allgemeinsymptome. Häufig treten dabei Abgeschlagenheit, Leistungsknick, Gewichtsabnahme und kardiale Dekompensationszeichen in Erscheinung, während Fieberschübe fast immer vorhanden sind. (Prange 2006) Im Rahmen der septisch-embolischen Enzephalitis sind außerdem Hauterscheinungen im Sinne der sogenannten Osler-Knötchen typisch, bei denen es sich um kleine subkutane Embolien an Fingern und Füßen handelt. Erstes Anzeichen für den ZNS-

Befall kann das Auftreten einer transitorisch-ischämischen Attacke (TIA) sein. Während die septisch-embolische Enzephalitis häufig durch einen apoplektiformen Krankheitsbeginn gekennzeichnet ist, manifestiert sich die septisch-metastatische Enzephalitis eher mit allgemeinen neurologischen Symptomen, wie Meningismus, psychopathologischen Auffälligkeiten, Somnolenz, Erbrechen und Schwindel. Dabei sind fokale neurologische Defizite anfangs geringer ausgeprägt, können aber im weiteren Krankheitsverlauf je nach betroffener Hirnregion in Erscheinung treten. In diesem Rahmen sind Mono- und Hemiparesen, Aphasien, aber auch eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) möglich. Das Intervall zwischen initialen Symptomen und neurologischen Ausfallerscheinungen ist bei der septisch-metastatischen Enzephalitis in der Regel gegenüber der septisch-embolischen Enzephalitis verkürzt. (Bitsch et al. 1996, Prange 2006)

Diagnostik

Die Diagnostik der septischen Herdenzephalitis beinhaltet neben der Feststellung der allgemeinen Sepsiskriterien den Nachweis einer ZNS-Beteiligung. Dabei ist der Einsatz bildgebender Verfahren insbesondere bei der septisch-embolischen Enzephalitis von Bedeutung. Mittels CCT und MRT können ischämische Läsionen und intrazerebrale Blutungen als Korrelate einer ZNS-Beteiligung nachgewiesen werden. Des Weiteren sollte bei Verdacht auf eine septische Herdenzephalitis stets eine Lumbalpunktion mit anschließender Liquoranalytik durchgeführt werden. Dadurch lassen sich in der Regel typische entzündliche Veränderungen, wie eine granulozytäre oder gemischte Pleozytose, eine Gesamtproteinerhöhung und ein Anstieg des Laktates feststellen. Eine intrathekale Immunglobulinsynthese (meist IgA) ist nicht immer nachweisbar, kann jedoch auf einen schon länger bestehenden ZNS-Befall hindeuten. Die Liquorbefunde sind im besonderen Maße bei der septisch-metastatischen Enzephalitis ausgeprägt und für die diagnostische Verifizierung von großer Bedeutung. (Prange 2006)

Therapie

Der Krankheitsverlauf ist bei Patienten mit septischen Herdenzephalitiden in der Regel schwer und die Aufnahme auf eine Intensiv- oder Überwachungsstation immer indiziert. Die Prognose ist dabei von dem Intervall zwischen dem Auftreten erster neurologischer Symptome und dem Beginn der Antibiotikatherapie abhängig. Diese sollte bereits auf den begründeten Verdacht hin unmittelbar nach Entnahme der Blutkulturen erfolgen. Solange der Erreger nicht bekannt ist, wird die septisch-embolische Enzephalitis mit einer Kombination aus Rifampicin und Ceftriaxon behandelt. Liegt als Ursache die bakterielle Besiedelung einer

künstlichen Herzklappe oder eines anderen Kunststoffimplantates zugrunde, wird Vancomycin anstelle von Rifampicin und ein zusätzliches Aminoglykosid verabreicht. Des Weiteren sollte das infizierte Implantat, wenn möglich, entfernt werden. Bei der septisch-metastatischen Herdenzephalitis wird zunächst die gleiche Antibiotika-Kombination angewendet mit einer zusätzlichen Gabe von Metronidazol. Auch hier sollte der Streuherd schnellstmöglich identifiziert und entfernt werden. Sobald das Resistogramm vorliegt, wird die Antibiotikatherapie dem Erregerspektrum angepasst. Die Prognose der beiden Varianten der septischen Herdenzephalitis ist unterschiedlich. Die hohe Letalität der septisch-embolischen Form scheint unter anderem durch eine zu späte Krankheitserkennung, fragwürdige Therapieentscheidungen und eine zu hoch dosierte Heparinisierung bedingt zu sein, wobei letztere das Risiko für intrakranielle Blutungen erhöht. Bei Überlebenden können häufig schwere Residualsyndrome mit persistierenden Paresen oder psychopathologischen Veränderungen beobachtet werden und eine vollständige Wiederherstellung des Ausgangszustandes ist nur selten möglich. Im Gegensatz dazu hat die septisch-metastatische Herdenzephalitis eine bessere Prognose. Hier bleibt lediglich eine leichte Residualsymptomatik bestehen und über die Hälfte der Patienten erreicht eine *Restitutio ad integrum*, das heißt eine Abheilung der Erkrankung ohne bleibende Schäden. (Prange 2006)

2.2.2 Die septische Enzephalopathie

Definition und Epidemiologie

Die septische Enzephalopathie kennzeichnet eine „diffuse Funktionsstörung des ZNS mit neurologischen und psychischen Symptomen im Rahmen einer Sepsis nach Ausschluss anderer Ursachen“ (Bolton et al. 1993). Es handelt sich um ein bisher nur unscharf definiertes Krankheitsbild, welches im Zusammenhang mit einer Sepsis steht und sich negativ auf die Überlebensrate auswirkt. So stieg in einer Studie von Sprung et al. die Mortalität von 26% bei Sepsispatienten mit normalen mentalen Status auf etwa 49% bei Patienten mit verändertem Bewusstseinszustand. Ein Sepsis-assoziiertes Delirium kann demnach als Indikator für ein schlechteres Outcome angesehen werden (Sprung et al. 1990). Angaben über die Inzidenz variieren in Abhängigkeit von der Definition und der Untersuchungsmethode zwischen 9% und 71% (Eidelman et al. 1996). Die septische Enzephalopathie ist auf Intensivstationen die häufigste Form einer Enzephalopathie und tritt gehäuft bei vorbestehenden ZNS-Läsionen auf (Bleck et al. 1993).

Pathogenese

Die Pathogenese der septischen Enzephalopathie ist multifaktoriell und noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Gegensatz zu den Herdenzephalitiden scheint jedoch der direkte Erregerbefall des ZNS keine entscheidende Rolle zu spielen. In der Literatur werden aktuell diverse pathogenetische Faktoren diskutiert, die im Folgenden beschrieben sind.

Die Reaktion des Gehirns auf Stress wird physiologisch durch ein aktivierendes Signal getriggert, welches über einen neuralen und einen humoralen Weg vermittelt werden kann. Eine Leitungsbahn stellt der Nervus Vagus dar, der viszerale Entzündungsreaktionen über axonale Zytokinrezeptoren erkennen kann. Dabei induzieren Entzündungsmediatoren aus geschädigten Geweben Signale, die über afferente Bahnen in den Nucleus solitarius im Hirnstamm weitergeleitet werden. Über nachfolgende Vagusefferenzen wird die Zytokinsynthese über eine cholinerge anti-inflammatorische Signalweiterleitung gehemmt (Entzündungsreflex). Des Weiteren ist der Vagusnerv mit anderen autonomen Zentren, wie z.B. dem Nucleus paraventricularis verbunden, der u.a. die Sekretion von Vasopressin steuert. Die humorale Bahn umfasst den Plexus choroideus die sogenannten zirkumventrikulären Organe (CVOs), welche in der unmittelbaren Umgebung der neuroendokrinen und neurovegetativen Kerngebiete lokalisiert sind und keine Blut-Hirn-Schranke aufweisen. CVOs exprimieren Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Sobald eine systemische oder viszerale Entzündungsreaktion über einen der beiden Wege entdeckt wird, erfolgt die Weiterleitung eines aktivierenden Signals in neurovegetative und neuroendokrine Zentren sowie in Verhaltenszentren des Gehirns. Eine Sepsis verstärkt dadurch die Freisetzung von verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im ZNS. Im Vordergrund stehen dabei $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{TGF-}\beta$ und MCP-1. Diese Mediatoren verändern die Expression bestimmter Rezeptoren der Neurone und können so zu einer Funktionsstörung führen. (Sonneville et al. 2013)

Eine weitere zentrale Rolle in der Genese der septischen Enzephalopathie scheint die endotheliale Aktivierung zu spielen. LPS und pro-inflammatorische Zytokine sind unter anderem in der Lage, die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (CD40, E-Selectin, ICAM-1) und IL1- und $\text{TNF-}\alpha$ -Rezeptoren zu triggern, die Produktion von $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ zu induzieren sowie die endotheliale NO-Synthase zu aktivieren. Diese Mediatoren treten wiederum in Interaktion mit den umgebenden Zellen und können deren Metabolismus über oxidativen Stress und Schädigung der Mitochondrien beeinflussen und so eine Apoptose induzieren. (Iacobone et al. 2009) Dem Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ kommt dabei eine

besondere Bedeutung zu, da es über die Regulation von Aquaporin 4 zu einem verstärkten Wassertransport ins Gehirn und somit zur Entwicklung eines Hirnödems beiträgt (Alexander et al. 2008). Studien konnten außerdem dokumentieren, dass es über die Wirkung von Entzündungsmediatoren zu einer veränderten Neurotransmission vor allem in den Regionen des Neokortex und Hippokampus kommen kann (Iacobone et al. 2009). Diese Veränderungen beziehen sich dabei auf die cholinerge, β -adrenerge, GABAerge und serotoninerge Signaltransduktion. Auch eine Veränderung des Aminosäure-Pools kann die Transmittersynthese beeinflussen und so zu zerebralen Dysfunktionen beitragen (Basler et al. 2002). Durch die Sepsis-bedingte anhaltende katabole Stoffwechsellaage kommt es zur Proteolyse des Muskelgewebes und zur vermehrten Freisetzung von Aminosäuren. Bei Patienten mit diagnostizierter Enzephalopathie konnte ein signifikanter Abfall der verzweigtkettigen gegenüber den aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) in Serum und Gehirn festgestellt werden, wobei vermutet wird, dass letztere als sogenannte „falsche Transmitter“ fungieren. Derartige Veränderungen der Aminosäurespiegel waren bereits in einem sehr frühen Stadium der Sepsis zu beobachten. Dabei scheint eine erhöhte Konzentration an aromatischen Aminosäuren mit einer erhöhten Mortalität bei Patienten im septischen Schock einherzugehen (Sprung et al. 1991).

Eine weitere wichtige Ursache für die Entwicklung einer septischen Enzephalopathie scheinen hämodynamische Störungen zu sein. Die Aktivierung des Endothels verändert den Gefäßtonus und induziert eine Koagulopathie sowie eine Störung der Mikrozirkulation, durch welche sowohl ischämische als auch hämorrhagische Läsionen begünstigt werden. Allerdings werden Veränderung der zerebralen Durchblutung (CBF) und eine gestörte Autoregulation im Rahmen einer Sepsis derzeit kontrovers diskutiert. (Iacobone et al. 2009) Neuen Erkenntnissen zufolge scheint für die Genese eines Sepsis-assoziierten Deliriums jedoch am ehesten die Reduktion der CO₂-induzierten vasomotorischen Reaktivität von Bedeutung zu sein, sodass auftretende Blutdruckschwankungen nicht mehr kompensiert werden können (Terborg et al. 2001). Eine weitere Konsequenz der endothelialen Aktivierung ist eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, was die Exposition des Gehirns gegenüber neurotoxischen Faktoren und die Infiltration durch Entzündungszellen begünstigt (Iacobone et al. 2009). Dabei scheint vor allem Glutamat eine entscheidende Rolle zu spielen (Toklu et al. 2009). Der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke konnte sowohl durch tierexperimentelle Studien (Jeppsson et al. 1981) als auch bei Sepsispatienten mit Hilfe einer Kernspintomographie des Gehirns belegt werden. Dabei waren die Defekte vor allem im

Bereich der Virchow-Robin'schen-Räume oder diffus in der weißen Substanz lokalisiert (Sharshar et al. 2007).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Reaktion des ZNS auf systemische Infektionen hauptsächlich über drei Mechanismen erfolgt: 1. neuronal 2. humoral und 3. über Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke, welche durch eine Endothelaktivierung induziert werden. Dabei führen letztendlich alle Wege zu einer Aktivierung von Mikroglia, die in der Pathogenese der septischen Enzephalopathie eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. (Sonneville et al. 2013)

Klinik

Aus klinischer Sicht erscheint eine Abgrenzung zur Herdenzephalitis problematisch. In der Literatur wird die septische Enzephalopathie auch als „Sepsis-assoziiertes Delirium“ beschrieben und ist durch einen akuten Beginn und eine potentielle Reversibilität der Symptome charakterisiert (Ebersoldt et al. 2007). Im Mittelpunkt stehen dabei psychopathologische Veränderungen wie Verlangsamung, Verminderung von Konzentration und Aufmerksamkeit, Halluzinationen sowie Störungen von Orientierung, Gedächtnis und der Vigilanz bis hin zu Stupor oder Koma. Häufig ist das Delirium mit einer Veränderung der motorischen Aktivität assoziiert, welche zwischen Agitation und Hypoaktivität variieren kann. Weitere, jedoch seltener auftretende motorische Symptome sind eine paratone Rigidität, d.h. ein aktiver Widerstand gegen passive Extremitätenbewegungen, ein „flapping tremor“ und multifokale Myoklonien. Auch epileptische Anfälle sind möglich, wobei diese fokal oder generalisiert sein können. (Iacobone et al. 2009) Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle genannten Symptome keineswegs spezifisch für eine septische Enzephalopathie sind, sondern auch im Rahmen anderer Erkrankungen des ZNS, insbesondere bei anderen metabolischen Enzephalopathien, auftreten können (Terborg 2012).

Diagnostik

Um eine septische Enzephalopathie feststellen zu können, sollte als Erstes eine gründliche neurologische Untersuchung mit vorrangiger Erhebung des psychopathologischen Befundes erfolgen (Terborg 2012). Dabei stehen für die Erkennung des Deliriums diverse validierte Scores wie der CAM-ICU (Truman und Ely 2003) oder der ICU-DSC-Test (Bergeron et al. 2001) zur Verfügung. Des Weiteren können zur Feststellung von Bewusstseinsstörungen die Glasgow Coma Scale (GCS) oder Skalen zur Beurteilung der Tiefe einer Sedierung, wie die RASS, genutzt werden (Sessler et al. 2002). Im Anschluss sollten auch Meningismus,

Motorik, Muskelkraft, Reflexe und die Hirnnerven überprüft werden. Im Falle von Herdzeichen ist eine zerebrale Bildgebung indiziert, um andere Ursachen einer Hirnfunktionsstörung wie Infarkte oder Blutungen auszuschließen. Dabei ist das MRT gegenüber dem CT von größerem Nutzen wenn es um die Erkennung eines frischen ischämischen Infarktes, Läsionen der weißen Hirnsubstanz oder einer Ruptur der Blut-Hirn-Schranke geht (Iacobone et al. 2009). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es eine Assoziation zwischen Sepsis und dem posteriorem reversiblen Enzephalopathiesyndrom (PRES) gibt. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Enzephalopathien, bei denen in dorsalen Hirnbereichen ein vasogenes Hirnödem auftritt, welches sich in der FLAIR-Wichtung hyperintens darstellt (Bartynski et al. 2006). Kommt es zu Krampfanfällen, Nackensteifigkeit oder anhaltenden Bewusstseinsstörungen ist zusätzlich ein EEG erforderlich. In den meisten Fällen lässt sich eine veränderte Aktivität nachweisen, welche mit dem Schweregrad der Enzephalopathie und der Letalität der Sepsis korreliert. Dabei treten je nach Ausmaß der zerebralen Dysfunktion vorwiegend Deltaaktivität, triphasische Wellen oder „Burst Suppression“- Muster auf (Young et al. 1992). Des Weiteren konnten Veränderungen in der Latenz und Amplitude somatosensorisch evozierter Potentiale (SEP) festgestellt werden, die im Gegensatz zu den anderen klinischen Untersuchungen nicht durch sedierende Medikamente beeinflusst werden (Zauner et al. 2002). Allerdings sind die SEP in der Diagnostik septischer Enzephalopathien bisher nur von geringer Bedeutung, da die Ableitung der Potentiale aufwendig und die Spezifität eher gering ist (Terborg 2012). Eine Lumbalpunktion mit anschließender Analyse des Liquors muss vor allem bei differenzialdiagnostischem Verdacht auf eine Meningitis oder Enzephalitis immer durchgeführt werden. Im Rahmen einer septischen Enzephalopathie zeigen sich jedoch lediglich unspezifische Eiweißerhöhungen (Terborg 2012). Neben diesen spezifischen Tests sollte auch eine Standard-Laboruntersuchung erfolgen, um andere Ursachen einer metabolischen Enzephalopathie auszuschließen oder eine bakterielle Infektion nachzuweisen. Für Letzteres bietet sich das Procalcitonin an, welches im Vergleich zum C-reaktiven Protein eine höhere Sensitivität und Spezifität für eine Sepsis besitzt (Luzzani et al. 2003). Als Biomarker für Zellschäden im Gehirn konnten erhöhte Serumwerte von S-100 β -Protein und neuronenspezifische Enolase (NSE) im Rahmen einer schweren Sepsis und im septischen Schock nachgewiesen werden. Allerdings sind diese sehr unspezifisch, da viele ZNS-Läsionen zu erhöhten Werten führen können (Nguyen et al. 2006).

Therapie

Bisher gibt es keine spezifische Therapie des Sepsis-assoziierten Deliriums, sondern man konzentriert sich in erster Linie auf die allgemeine Therapie der Sepsis. Dabei sind vor allem eine adäquate Antibiotikatherapie, eine ausreichende Oxygenierung, eine hämodynamische Stabilisierung sowie das Management bei Organversagen und metabolischen Störungen von Bedeutung (Reinhart et al. 2010). Aktuell werden diverse Maßnahmen diskutiert, die positive Effekte auf die pathophysiologischen Mechanismen der septischen Enzephalopathie haben könnten (Iacobone et al. 2009). So wirkt sich eine intensive Insulintherapie möglicherweise protektiv auf die Neuronen aus, da eine Hyperglykämie nachweislich oxidativen Stress und Apoptose induziert. Experimentelle Studien haben außerdem gezeigt, dass Steroide in der Lage sind, der systemischen Entzündungsreaktion entgegenzuwirken, Hirnödeme zu reduzieren und die Funktion der Blut-Hirn-Schranke zu verbessern. Des Weiteren soll aktiviertes Protein C anti-inflammatorische Effekte haben und zusätzlich protektiv auf das Endothel wirken. Eine weitere Option stellt die Modulation der Signaltransmission im Gehirn dar, wobei sich die Gabe von Cholinesteraseinhibitoren möglicherweise positiv auf den Verlauf einer Enzephalopathie auswirkt. Die Wirksamkeit der genannten spezifischen Maßnahmen konnte bisher jedoch nicht durch prospektive klinische Studien evaluiert werden. (Iacobone et al. 2009)

2.2.3 Neuropathologische Befunde

In der Literatur existieren insgesamt nur wenige Beschreibungen von neuropathologischen Befunden im Rahmen einer Sepsis.

Eindeutige Befunde lassen sich bei der septisch-embolischen Herdenzephalitis feststellen. Hier können eine thrombogene Quelle sowie einzelne thrombembolische Herdbefunde im Gehirn nachgewiesen werden. Dabei kommen sowohl ischämische Nekrosen, als auch pyoseptische Herde vor, welche meist in der Umgebung kleinerer Gefäße lokalisiert sind und vorzugsweise aus Granulozyten bestehen. (Prange 2006) Für die septisch-metastatische Herdenzephalitis scheint hingegen das Auftreten von Mikroabszessen charakteristisch zu sein, wie Pruitt et al. bereits 1978 in ihrer Arbeit beschreiben. Dabei sind die Mikroabszesse vorrangig an der Mark-Rinden-Grenze des Neokortex und im Bereich der Basalganglien oder des Thalamus lokalisiert. (Pruitt et al. 1978) Prange beschreibt im Rahmen der septischen Herdenzephalitis zusätzlich knötchenartige Gliareaktionen im Hirnparenchym als Zeichen der lokalen Entzündung (Prange 2006). In einer aktuellen Studie von Tauber et al. wurde die Pathologie der septisch-metastatischen Enzephalitis des Weiteren als ein Nebeneinander von

degenerativen Prozessen und regenerativer Aktivität charakterisiert. Es wurden einerseits diffuse axonale Schädigungen und Demyelinisierungen, vorwiegend im frontalen Cortex, und andererseits eine zunehmende Zellproliferation im Gyrus dentatus der Hippokampusformation nachgewiesen. Darüber hinaus war die mittlere Dichte Iba-1 markierter, aktivierter Mikroglia bei Patienten mit septisch-metastatischer Enzephalitis erhöht, verfehlte jedoch statistische Signifikanz. (Tauber et al. 2011)

Im Gegensatz zur Beschreibung der septischen Herdenzephalitis variieren die neuropathologischen Befunde zur septischen Enzephalopathie sehr stark, Begriffe werden uneinheitlich verwendet und die Patientenkollektive sind sehr heterogen, sodass eine Vergleichbarkeit nur bedingt gegeben ist. So beschreiben zum Beispiel Jackson et al. in einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 1985 bei Patienten mit Enzephalopathie und gesicherter bakterieller Infektion disseminierte Mikroabszesse bei 8 von 12 Patienten, außerdem eine kortikale Proliferation von Astrozyten und Mikroglia, Infarkte, fokale Purpura cerebri, multiple Marklagerhämmorrhagien sowie zentrale pontine Myelinolyse (Jackson et al. 1985). Ähnliche Läsionen konnten auch im Rahmen einer Studie von Bleck et al. festgestellt werden, bei welcher 4 Patienten neuropathologisch untersucht wurden. In diesem Kollektiv zeigte jedoch keiner der Patienten Mikroabszesse (Bleck et al. 1993). In einer Studie von Pendlebury wurden ebenfalls Patienten mit nachgewiesener Infektion und Verdacht auf eine Beteiligung des ZNS neuropathologisch untersucht. Alle Patienten waren chronisch krank, litten größtenteils unter einer Immunsuppression und häufig lag eine Sepsis vor. Bei 35 von 92 Patienten konnten abermals multiple Mikroabszesse nachgewiesen werden und man schlussfolgerte, dass diese eine sehr häufige Manifestation von Infektionen des ZNS darstellen (Pendlebury et al. 1989). Im Gegensatz dazu beschrieben Sharshar et al. in einer postmortalen Analyse ischämische Läsionen in Ischämie-vulnerablen Regionen bei allen 23 untersuchten Patienten, die im septischen Schock verstarben. Mikroabszesse wurden nur selten beschrieben (9%), während zerebrale Hämmorrhagien in 26% der Fälle detektiert werden konnten. Auch im Rahmen dieser Studie wurde eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten als Korrelate der Entzündungsreaktion festgestellt. Im Vergleich zu einer Patientengruppe, die im nicht-septischen Schock oder an anderen Ursachen verstarb, waren die Ischämien und die Apoptoserate vor allem in den autonomen Zentren des ZNS signifikant stärker ausgeprägt, was zu einer erhöhten Mortalität der septischen Enzephalopathie beigetragen haben könnte. (Sharshar et al. 2004) Bei den beschriebenen Studien ist zu beachten, dass die aktuelle Definition der septischen Enzephalopathie nicht immer streng

eingehalten wurde und Fälle mit Mikroabszessen eher als septisch-metastatische Enzephalitis klassifiziert werden sollten.

Im Rahmen einer retrospektiven Untersuchung sämtlicher Hirnautopsien an der FSU Jena aus dem Jahr 2007 (n=220), fanden sich 4 (2%) klassische Herdenzephalitiden mit Mikro- oder Makroabszessen (Romeike et al. 2011). Darüber hinaus wurden bei 8 (4%) weiteren Gehirnen als Zeichen einer akuten Inflammation sogenannte Mikrogliaknötchen festgestellt. Trotz der Durchführung verschiedener histochemischer Methoden, konnte keine direkte mikrobielle Invasion im Zusammenhang mit den Mikrogliaknötchen nachgewiesen werden. Demnach könnte postuliert werden, dass gerade die Mikrogliaknötchen das morphologische Korrelat der septischen Enzephalopathie darstellen, nicht zuletzt weil sie sich histomorphologisch ausreichend von Mikroabszessen einer septischen Herdenzephalitis unterscheiden. Darüber hinaus könnten Mikrogliaknötchen ein ausgesprochen frühes Anzeichen für eine Sepsis sein, wobei sich die Hirnregion der Medulla oblongata als Prädilektionsort für das Auftreten von Mikrogliaknötchen herausstellte. (Romeike et al. 2011)

2.3 Mikroglia

2.3.1 Definition und Ursprung

Zusammen mit den Astrozyten und Oligodendrozyten bildet die Mikroglia die Gruppe der sogenannten Neuroglia, wobei der Anteil der Mikroglia etwa 20% ausmacht (Streit und Kincaid-Colton 1995). Gliazellen stellen eine Art Stützgewebe im Nervensystem dar, welches die Neuronen umgibt und deren Funktion unterstützt, aber im Gegensatz zu ihnen nicht direkt an der Erregungsleitung beteiligt ist. Dabei kommen Gliazellen 10-50 mal häufiger als Neurone im ZNS vor. (Kandel et al. 2000) Erstmals wurde die Mikroglia als eigene Zellpopulation im 19. Jahrhundert durch den Neuropathologen Nissl beschrieben (Nissl 1899). Allerdings gelang erst durch den spanischen Neuroanatom del Rio-Hortega 1932 die spezifische Darstellung und Klassifikation der Mikroglia mittels Silberkarbonat-Färbung (Del Rio-Hortega 1932). Außerdem ergaben sich durch seine Untersuchungen erste Vermutungen bezüglich der Herkunft der Mikroglia. Der ontogenetische Ursprung der Mikroglia wurde daraufhin in der Vergangenheit kontrovers diskutiert (Kaur et al. 2001, Chan et al. 2007). Die wichtigsten Hypothesen umfassen dabei die mesodermale Herkunft (Ling et al. 1980), die neuroektodermale Abstammung (Alliot et al. 1999), die perizytäre Transformation (Baron und Gallego 1972) sowie den Ursprung der Mikroglia aus subependymalen, Ventrikel-assoziierten Makrophagen (Lewis 1968). Heutzutage wird allerdings von den meisten Wissenschaftlern die Hypothese der Abstammung der Mikroglia von myeloiden-monozytären Zellen und/oder

deren hämatopoetischen Vorläufer unterstützt (Tambuyzer et al. 2009). Dabei gibt es Hinweise, dass möglicherweise verschiedene Formen von Mikroglia-Zellen existieren, die sich anhand ihrer Oberflächenmarker, ihrer Morphologie und in ihrem Ursprung unterscheiden (Rezaie et al. 2005). Zum einen soll es bereits während der embryonalen Entwicklung vor Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke zur Einwanderung von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Dottersack ins ZNS kommen (Ginhoux et al. 2010). Zum anderen wird eine Form von Mikroglia-Zellen beschrieben, die aus den im Blut zirkulierenden monozytären Vorläufern hervorgeht und sich etwa zum Zeitpunkt der Geburt und postnatal im ZNS ansiedeln soll (Rezaie et al. 2005). Obwohl residente Mikroglia im gesunden Hirnparenchym nur einen geringen Zellumsatz haben, gibt es Hinweise dafür, dass unter bestimmten pathologischen Bedingungen eine Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Monozyten aus dem Knochenmark stattfindet (Lassmann und Hickey 1993). Trotz anhaltender Debatten über die genaue Herkunft und die Entwicklungsmechanismen, gilt die Zugehörigkeit der Mikroglia zum mononukleären-phagozytären System als gesichert, nicht zuletzt durch den Nachweis Makrophagen-spezifischer Antigene mittels immunhistochemischer Methoden (Perry et al. 1985, Streit und Kreutzberg 1987).

Mikroglia stellen somit die gewebetypischen Makrophagen des ZNS dar und sind mit residenten Gewebsmakrophagen anderer Organe, wie z.B. den Kupffer'schen Sternzellen der Leber, zu vergleichen. Als Vertreter des monozytären Makrophagen-Systems handelt es sich demnach um immunkompetente Zellen, welche die unspezifische Immunabwehr des ZNS darstellen. (Chan et al. 2007)

2.3.2 Funktion und morphologische Zustände

Mikroglia können in zwei Zuständen vorkommen, als ruhende und aktivierte Zellen. In Abhängigkeit ihres Aktivitätszustandes und ihrer Lebensphase sind sie in eine Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. So spielen Mikroglia als Teil des Immunsystems bei der Antigenpräsentation, der Erkennung von Pathogenen sowie der Phagozytose und Eliminierung von Fremdkörpern und Zellfragmenten eine Rolle. (Tambuyzer et al. 2009) Mikroglia haben eine spezielle, sich klar von den Makrophagen anderer Gewebe unterscheidende Morphologie. Diese typische und unter physiologischen Bedingungen meist vorkommende Morphologie ist gekennzeichnet durch einen gestreckten Zellkörper mit vielen feinen Fortsätzen. Die damit vergrößerte Oberfläche befähigt die Zelle mit ihrer Umgebung in Kontakt zu treten und Änderungen des Milieus wahrzunehmen. Diese Form der Mikroglia wird auch als ramifiziert bezeichnet und wurde in der Vergangenheit mit

einem ruhenden bzw. inaktiven Zustand gleichgesetzt. (Boche et al. 2013) Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass die Zellfortsätze der ramifizierten Mikroglia sich tatsächlich in ständiger Bewegung befinden und scheinbar aktiv mit der Umgebung interagieren (Nimmerjahn et al. 2005). Die Fortsätze einer Zelle treten dabei sowohl mit Astrozyten und Neuronen, als auch mit den Fortsätzen benachbarter Mikroglia in Kontakt, sodass sie ein Netzwerk ausbilden, das sich durch das gesamte ZNS zieht. Ein charakteristisches Merkmal der Mikroglia ist ihre schnelle Aktivierung in Reaktion auf diverse Schädigungen des ZNS, die durch Infektionen, Entzündungen, Traumata, Ischämien, Tumoren oder neurodegenerative Erkrankungen hervorgerufen werden können. Dabei sind sie in der Lage bereits auf geringste pathologische Veränderungen in ihrer Umgebung zu reagieren. Die Aktivierung von Mikroglia geht meist der Reaktion anderer Zelltypen voraus und ist unter anderem durch einen morphologischen Wandel der Zellen gekennzeichnet. (Kreutzberg 1996) Es erfolgt eine Transformation der ramifizierten zu sogenannten amoeboiden Mikroglia. Diese Zellen weisen eine typische Makrophagen-Morphologie auf, welche durch eine rundliche Form, das weitgehende Fehlen von Zellfortsätzen sowie das Vorhandensein zahlreicher phagozytotischer Vakuolen charakterisiert ist. Im Gegensatz zum ramifizierten Typ, sind die Makrophagen-ähnlichen Zellen mobil und können zum Ort der Schädigung migrieren. (Boche et al. 2013) Außer bei pathologischen Abläufen, kommen amoeboiden Mikroglia auch im sich entwickelnden Gehirn vor. Während sie im perinatalen Hirn der vorherrschende Zelltyp sind, nimmt ihre Anzahl im Verlauf der postnatalen Reifung ab, bei gleichzeitigem Anstieg des ramifizierten Typs. (Rezaie et al. 2005)

2.3.3 Rolle der Mikroglia bei Inflammation

Unter physiologischen Bedingungen werden Mikroglia streng über die Interaktionen mit umgebenden Neuronen reguliert und können durch bestimmte Signale, die auf einen Parenchymschaden oder eine Entzündung hinweisen, aktiviert werden (Ponomarev et al. 2011). Ähnlich wie bei den peripheren Makrophagen können je nach Aktivierungsmechanismus zwei Phänotypen der aktivierten Mikroglia als Modulatoren der Inflammation unterschieden werden. Der erste Phänotyp (M1) entsteht durch die Stimulation der ruhenden Mikroglia durch pro-inflammatorische Zytokine (z.B. IF- γ) und hat die Produktion und Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6) und reaktiver Sauerstoffspezies durch die Zelle zur Folge. Dadurch können umliegende Zellen geschädigt und so die pathologischen Prozesse weiter verstärkt werden. Über anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) entsteht hingegen ein zweiter Phänotyp (M2)

aktivierter Mikroglia, welcher durch die Freisetzung von neurotrophen (TGF- β , IGF-1) und angiogenen Faktoren (VEGF) den Umbau und die Reparatur des Gewebes fördert. (Block et al. 2007, Fumagalli et al. 2011) Obwohl Mikroglia hauptsächlich lokale Signale empfangen, kann sich auch eine systemische Entzündung auf die Funktion der Mikroglia auswirken. Dieser Effekt wird durch eine bidirektionale Signaltransmission zwischen Immunsystem und Gehirn bedingt und könnte ein möglicher Mechanismus sein, über den eine systemische Entzündung auf den Verlauf von Erkrankungen des ZNS Einfluss nimmt (Teeling und Perry 2009). So wird aktuell vermutet, dass die Aktivierung von Mikroglia entscheidend zur Entwicklung eines Deliriums im Rahmen einer systemischen Infektion beiträgt. Eine verminderte cholinerge Aktivität im ZNS kann dazu führen, dass die Mikroglia neurotoxisch auf andere Zellen wirken und über neuro-inflammatorische Reaktionen eine langfristige kognitive Dysfunktion bedingen (van Gool et al. 2010). Somit könnte die Aktivierung von Mikroglia eine der ersten Veränderungen darstellen, die im Rahmen einer septischen Enzephalopathie beobachtet werden können. Eine frühe Aktivierung von Gliazellen im Rahmen einer durch LPS induzierten peripheren Inflammation konnte bereits am Tiermodell nachgewiesen werden. Dies gelang zum einen über die Quantifizierung der immunhistochemisch gekennzeichneten aktivierten Mikroglia (Semmler et al. 2005) und zum anderen anhand der Messung erhöhter Konzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β , welches den aktivierten Zustand der Mikroglia erfasst (Henry et al. 2009). Eine weitere Studie demonstrierte am Affenmodell mittels PET-Bildgebung eine Aktivierung von Mikroglia nach LPS-induzierter systemischer Entzündung (Hannestad et al. 2012).

Im Rahmen von verschiedenen entzündlichen ZNS-Erkrankungen werden darüber hinaus sogenannte Mikrogliaknötchen als unspezifische zelluläre Reaktionen beschrieben. So wurden Mikrogliaknötchen unter anderem bei einer HIV-Enzephalitis und mit dieser häufig im Zusammenhang stehenden Infektion durch opportunistische Erreger, wie zum Beispiel dem Zytomegalievirus, gefunden (Budka 1991, Morgello et al. 1987, Nebuloni et al. 2000). Außerdem konnten sie häufig bei Patienten mit Multipler Sklerose, einer chronisch-entzündlichen ZNS Erkrankung, nachgewiesen werden (Singh et al. 2013). Das Auftreten der Knötchen in der weißen Substanz wird dabei als ein frühes Stadium der typischen MS-Läsionen angenommen. Aber auch im Zusammenhang mit einem septischen Geschehen wurden Mikrogliaknötchen beobachtet. So beschrieb Prange „knötchenartige Gliareaktionen“ im Rahmen einer septischen Herdenzephalitis (Prange 2006) und in einer Studie von Lemstra et al. konnten ebenfalls kleine Zusammenlagerungen aktivierter Mikroglia im Kortex von Sepsispatienten festgestellt werden (Lemstra et al. 2007).

2.3.4 Immunphänotypisierung von Mikroglia

Eine große Herausforderung für die Identifizierung von Mikroglia stellt das Fehlen von spezifischen und zuverlässigen Markern, die Mikrogliazellen in Abhängigkeit ihres Aktivitätsstatus erkennen, dar. Heutzutage ist die Immunhistochemie an formalinfixierten Geweben eine weitverbreitete Methode zur Erkennung von Mikroglia-Proteinen *in situ* und äußerst informativ. Hierfür steht eine Vielzahl von immunhistochemischen Markern zur Verfügung. Verbreitete Anwendung finden derzeit Antikörper gegen HLA-DR, CD68 und CD163 zur Identifizierung von Mikroglia. Die Aussagekraft dieser Marker wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass jeweils nur ein auf der Oberfläche der Zellen exprimiertes Protein erkannt wird. (Boche et al. 2013)

Bei HLA-DR, DP, DQ handelt es sich um in der Zellmembran verankerte Glykoproteine, die zum System der humanen Leukozytenantigene (HLA-System) gehören. Die HLA-Moleküle werden durch ein Cluster eng verknüpfter Gene auf Chromosom 6 kodiert und lassen sich topografisch in drei Klassen einteilen. Das HLA-DR-Antigen ist dabei ebenso wie HLA-DQ und HLA-DP ein Isotyp der Klasse II und besteht aus einer schweren α - und einer leichteren β -Kette, die beide in der Zellmembran verankert sind. HLA-Klasse-II-Moleküle werden im Wesentlichen auf antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert, können aber auch auf zytotoxischen/Suppressor-T-Lymphozyten oder aktivierten Granulozyten lokalisiert sein. Die Hauptfunktion der HLA-DR-, DP- und DQ-Moleküle besteht in der Präsentation größtenteils exogener Antigenpeptide gegenüber den CD4-positiven T-Zellen. (Navarrete 2000) Lange Zeit wurde die Abwesenheit von HLA-Klasse-II exprimierenden Zellen im gesunden menschlichen Hirn als Beweis für den immunprivilegierten Status des ZNS angesehen (Daar et al. 1984). Durch verbesserte immunhistochemische Färbetechniken konnte jedoch mittlerweile eine konstitutive Expression von HLA-DR auf den Mikroglia-Zellen sowohl im gesunden, als auch im erkrankten ZNS festgestellt werden (Gehrmann et al. 1993). Dabei exprimieren ruhende Mikroglia im normalen Hirngewebe vorrangig HLA-DR, während aktivierte Mikroglia neben einer gesteigerten HLA-DR Expression zusätzlich HLA-DP und –DQ Moleküle exprimieren (Ulvestad et al. 1994). Antikörper gegen HLA-DR färben Mikroglia somit weitgehend unabhängig von ihrer Morphologie und ihrem Aktivierungszustand (Kim und de Vellis 2005). Der am weitesten verbreitete Marker für Mikroglia ist CD68. Dabei handelt es sich um ein stark glykosyliertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa. Es gehört der lysosomal/endosomal-associated membrane glykoprotein (LAM) Familie an, wo es bei der Endozytose und lysosomalen Transporten eine Rolle spielt. CD68 ist primär in

zytoplasmatischen Granula lokalisiert, wird aber auch schwach auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und natürlichen Killerzellen exprimiert. Des Weiteren wird CD68 von ca. 40% der B-Zellen im peripheren Blut exprimiert und tritt auch im Zytoplasma von nicht-hämatopoetischen Geweben wie Leber und Niere auf. (Goyert 1998) Aufgrund dessen gilt CD68 nicht als besonders spezifischer Marker für Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe, wird aber dennoch häufig als Marker für diese Zellen in diagnostischen immunhistochemischen Analysen eingesetzt (Weiss et al. 1994). Im Gegensatz zu vielen anderen Leukozytenantigenen ist das CD68-Protein sehr heterogen und verschiedene Antikörper können so zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führen (Weiss et al. 1994, Falini et al. 1993). Unter den vielen zur Verfügung stehenden Antikörper-Klonen, welche CD68 erkennen, sind KP1 und PG-M1 die am häufigsten in der Pathologie verwendeten, da beide eine stabile Immunreaktivität in paraffineingebetteten Gewebe zeigen (Weiss et al. 1994, Falini et al. 1993, Pulford et al. 1989). Als lysosomale Membranmarker färben CD68-Antikörper im Gegensatz zu HLA-Antikörpern vor allem hoch aktive, phagozytierende Mikroglia (Zotova et al. 2011).

Das Glykoprotein CD163 (130 kDa) gehört zur Superfamilie der Scavenger Rezeptoren Typ B. Dieser ist in der Lage, Calcium-abhängig Komplexe aus Hämoglobin und Haptoglobin zu binden und über anschließende Endozytose aus der Zirkulation zu entfernen (Kristiansen et al. 2001). Darüber hinaus kann CD163 Bakterien erkennen und spielt möglicherweise eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr (Fabriek et al. 2009). Immunhistochemische Studien mit diversen monoklonalen Antikörpern haben gezeigt, dass CD163 ausschließlich von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe exprimiert wird (Radzun et al. 1987, Zwadlo et al. 1987). Die Expression scheint dabei auf eine Subpopulation von Gewebsmakrophagen begrenzt zu sein und somit abhängig vom Stadium der Differenzierung bzw. dem Aktivitätsstatus der Makrophagen (Lau et al. 2004). Aktuell wird CD163 als Marker alternativ aktivierter (M2) bzw. anti-inflammatorischer Makrophagen angesehen (Komohara et al. 2006). Dabei konnte die Expression während der späten down-regulatorischen Phase einer akuten Inflammation (Zwadlo et al. 1987) sowie im Rahmen von chronischen Entzündungsreaktionen (Topoll et al. 1989) gezeigt werden. Während sich die Expression von CD163 im gesunden Hirnparenchym auf perivaskuläre Makrophagen beschränkt, zeigte sich eine Akkumulation CD163-positiver Zellen unter anderem bei HIV-Enzephalitis (Roberts et al. 2004), Multipler Sklerose (Fabriek et al. 2005) sowie im Rahmen traumatischer Hirnschädigungen (Zhang et al. 2012). In einer aktuellen Studie konnte eine Expression von CD163 der Mikroglia bei Patienten mit Alzheimer- und Parkinson-Erkrankungen beobachtet werden (Pey et al. 2014).

3 Ziele der Arbeit

Es existieren bislang nur wenige Beschreibungen zu neuropathologischen Befunden im Rahmen einer Sepsis und diese variieren mitunter sehr stark. Als gesichert kann jedoch die zentrale Bedeutung der Mikroglia für Entzündungsreaktionen im ZNS angesehen werden. Als immunkompetente residente Makrophagen sind sie an nahezu allen pathologischen Vorgängen im ZNS beteiligt. Charakteristisch ist indes die schnelle Transformation der Zellen vom ruhenden in einen aktivierten Zustand bei bereits geringsten Alternationen ihrer Umgebung. Dabei kommt es sowohl zu Veränderungen der Morphologie, als auch des Immunphänotyps der Zellen, was für die Bewertung der mikroglialen Aktivität bereits im Rahmen zahlreicher Studien genutzt wurde.

Basierend auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Romeike et al. sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Hypothese geprüft werden, ob das Auftreten von Mikrogliaknötchen gehäuft mit dem klinischen Verdacht auf eine Sepsis oder mit autoptischen Befunden einer Sepsis assoziiert ist.

Eine weitere Frage war, ob sich die Hirnregion der Medulla oblongata als Prädilektionsort für das Auftreten von Mikrogliaknötchen bestätigen lässt.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob nach Anwendung immunhistochemischer Methoden einerseits die Detektion von Mikrogliaknötchen optimiert werden kann und andererseits zusätzlich eine verstärkte diffuse mikrogliale Aktivierung bei Patienten mit Mikrogliaknötchen nachzuweisen ist.

Gleichzeitig galt es zu überprüfen, welche Routine-Antikörper für die aufgezeigten Fragestellungen am besten geeignet sind.

Schließlich sollte untersucht werden, ob Alter, Geschlecht oder häufige Begleiterkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Kreislaufstörungen bzw. zerebrale Ischämien, einen Einfluss auf die hier eingesetzten Untersuchungsmethoden haben.

In der Zusammenschau sollte letztlich die Frage beantwortet werden, ob sich anhand der eingesetzten Methoden charakteristische Hirnveränderungen beschreiben lassen, die sich für eine Klassifikation zur postmortalen Sepsisdiagnostik eignen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

In den Tabelle 1 bis Tabelle 5 sind die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Mikrotomie

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Mikrotom Leica RM2265	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Mikrotom-Klingen Stainless Steel, A35	Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland
Wasserbad Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Objekträger Superfrost Plus	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Präparatekästen	NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2: Geräte und Chemikalien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Geräte	Hersteller
Multistainer	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Nordbrand Nordhausen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Hämatoxylin nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die immunhistochemischen Färbungen und Mikroskopie

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Mikrowelle	Lifetec, Essen, Deutschland

Dako Autostainer Plus	Dako North America, Carpinteria, CA, USA
Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop DM 2500	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop-Kamera DS-Fi1	Nikon GmbH, Tokio, Japan

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Nordbrand Nordhausen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Dako TBST Tris Buffered Saline with Tween 20, 10x Concentrate	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (x10)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (x10)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Hämatoxylin nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Catalyzed Signal Amplification (CSA) System For Use with Mouse Primary Antibodies, Edition 06/07, Code K1500	Dako North America, Carpinteria, CA, USA
Dako Wash Buffer 10x	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Antikörper	Hersteller
Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DP, DQ, DR Antigen, Clone CR3/43	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone KP1, Ready-to-Use (Link)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Novocastra Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CD163	Leica Biosystems, Newcastle, UK

4.2 Methoden

4.2.1 Auswahl von Patienten und Kontrollen

Aus dem Dokumentationssystem des Instituts für Pathologie der FSU Jena wurden für den Zeitraum 2007 bis 2012 alle Hirnautopsien mit Nachweis von Mikrogliaknötchen ausgewählt. Da hierbei vorwiegend der Bereich der Medulla oblongata betroffen war, erschien eine Beschränkung auf diese Region für ein effizientes Screening naheliegend. Hierzu wurde eine nach Alter und Geschlecht angepasste Kontrollgruppe ohne Mikrogliaknötchen gebildet, bei der gleichfalls die Medulla oblongata analysiert wurde. Zusätzlich wurden klinische Daten und autopsische Befunde aus dem Dokumentationssystem und den Akten des Instituts für Pathologie der FSU Jena herangezogen. Die Kontrollgruppe wurde absichtlich größer gewählt, um ausreichend Patienten mit oder ohne klinische bzw. autopsische Diagnose einer Sepsis einzuschließen.

4.2.2 Herstellung der Präparate

Die Paraffinblöcke des zuvor in Formalin fixierten Materials wurden in einem Gefrierschrank für etwa 20 min bei -20 °C gekühlt. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden bei Raumtemperatur von jedem Paraffinblock mehrere jeweils 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden anschließend in ein ca. 40 °C warmes Wasserbad verbracht und gestreckt. Mittels visueller Qualitätsprüfung wurde sichergestellt, dass die Schnitte an einem Stück und ohne Materialverlust erfolgten. Danach wurden die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen. Ergebnis dieser Prozedur waren jeweils 10 faltenfrei fixierte Schnitte. Diese wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet, bevor sie zur Aufbewahrung in Präparatekästen überführt wurden.

4.2.3 Histochemische und immunhistochemische Färbungen

4.2.3.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) handelt es sich um eine in der Pathologie weit verbreitete Routinefärbemethode, die in erster Linie zur orientierenden Darstellung der Morphologie dient. Dabei werden alle azidophilen Zellstrukturen, wie Zytoplasmabestandteile und Mitochondrien, durch Eosin rot und alle basophilen Strukturen, vor allem die Zellkerne, durch Hämatoxylin blau angefärbt. (Avwioro 2011) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde von jedem Patienten jeweils ein Gewebeschnitt der Medulla oblongata mittels HE gefärbt. Dabei diente die Färbung einerseits der orientierenden Übersicht und andererseits der Überprüfung, ob die im Dokumentationssystem des Instituts für Pathologie der FSU Jena

beschriebenen Mikrogliaknötchen auch in den aktuellen Anschnitten der Medulla oblongata noch nachweisbar sind.

Die HE-Färbungen erfolgten im Multistainer des Eingangslabors des Institutes für Pathologie der FSU Jena nach folgendem Protokoll (vgl. Tabelle 6):

Tabelle 6: Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Schritt	Reagenz	Zeit (in min)
1	Xylol	3:00
2	Xylol	2:00
3	Xylol	1:00
4	100% Alkohol	1:20
5	96% Alkohol	1:20
6	70% Alkohol	1:20
7	Aqua destillata	0:15
8	Hämatoxylin nach Mayer	4:00
9	Hämatoxylin nach Mayer	4:00
10	Fließwasser	5:00
11	Eosin	4:00
12	70% Alkohol	1:20
13	96% Alkohol	1:20
14	100% Alkohol	1:20
15	100% Alkohol	1:20
16	Xylol	2:00
17	Xylol	1:00

4.2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Mikroglia

Zur Identifizierung von Mikroglia im ZNS wurde der immunhistochemische Nachweis der Antigene CD68, CD163 und HLA-DR, DP, DQ gewählt. Die entsprechenden Antikörper sind bereits für andere Fragestellungen im Jenaer Institut für Pathologie im Routine-Einsatz und mussten lediglich für die Verwendung an Hirngewebe optimiert werden.

Antikörper

Für den Nachweis des HLA-DR Antigens wurde der monoklonale Mausantikörper gegen HLA-DP, DQ, DR Antigen (Klon CR3/43) verwendet. Dieser reagiert mit der β -Kette des α - β -Heterodimers aller Produkte der Genfamilien DP, DQ und DR und wurde auf dem „First International Workshop and Conference on Monoclonal Antibodies to Human MHC Class II Antigens (1983)“ in die Liste aufgenommen (De Zen et al. 2000). Das in flüssiger Form als Zellkulturüberstand gelieferte Maus-IgG-Konzentrat wurde vor Anwendung mit einem Antikörper Diluenten im Verhältnis 1:500 verdünnt. Des Weiteren wurde ein Antikörper ausgewählt, der gegen das nachzuweisende Antigen CD68 gerichtet ist. Es handelte sich hierbei um einen gebrauchsfertigen monoklonalen Maus-Antikörper (Klon KP1, Isotyp IgG1) in flüssigem Puffer, welcher zur immunhistochemischen Verwendung in Verbindung mit Autostainer Link-Geräten bestimmt ist. Dieser markiert Makrophagen und andere Mitglieder der mononukleären Phagozyten-Reihe und dient zur Erkennung von Neoplasmen myeloiden Ursprungs und aus Makrophagen/Monozyten (Warnke et al. 1989). Als dritter Marker wurde ein gegen das humane CD163-Antigen gerichteter monoklonaler Mausantikörper (Klon 10D6, Isotyp IgG1) verwendet. Vor der Anwendung erfolgte ebenfalls eine Verdünnung von 1:500 mit dem entsprechenden Antikörper Diluenten.

Prinzip des Färbeverfahrens

Der Nachweis der Antigene CD68, CD163 und HLA-DR erfolgte als indirekte immunhistochemische Färbung mit Hilfe des „Catalyzed Signal Amplification“ (CSA)-Systems. Die in diesem System verwendete Methode basiert auf der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode (ABC-Methode) für Paraffinschnitte. Dieses 1981 von Hsu eingeführte Verfahren stellt aufgrund seiner hohen Sensitivität heutzutage die gebräuchlichste Methode zum *in situ* Nachweis von Antigenen dar (Hsu et al. 1981). Sie beruht auf der starken Affinität von Streptavidin bzw. Avidin für Biotin. Dabei fungieren sekundäre biotinylierte Antikörper als Linker zwischen gewebsgebundenen Primärantikörpern und dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Kumar und Rudbeck 2009). Bei dem CSA-System handelt es sich um eine extrem sensible immunhistochemische Färbemethode, welche eine Signalamplifikation auf Basis der peroxidasekatalysierten Ablagerung einer biotinylierten Phenolverbindung beinhaltet (Bobrow et al. 1989). Hierfür wird zunächst ein gegen das gesuchte Antigen gerichteter primärer Maus-Antikörper mit Hilfe eines biotinylierten sekundären Antikörpers nachgewiesen. Anschließend erfolgt dessen Bindung über Streptavidin an einen Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Im nächsten Schritt wird gebundene Peroxidase verwendet, um

eine Präzipitation auf die Probe von biotinyliertem Phenol zu katalysieren. Dies führt zu einer Amplifikation der Anzahl der verfügbaren Biotinmoleküle, die für die Bindung der Streptavidinperoxidase notwendig sind. Die Färbung wird mit Diaminobenzidin als Chromogen abgeschlossen, was zu einem braungefärbten Präzipitat an der Antigenstelle führt. (Dako 2006/2007)

Durchführung der Immunhistochemie

Im Folgenden soll der genaue Ablauf des Färbeprozesses stellvertretend für alle in der vorliegenden Arbeit betrachteten Antigene beschrieben werden.

Zur Vorbereitung wurden die Paraffinschnitte zunächst routinemäßig entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Für die Entfernung des Paraffins wurden die Präparate zweimal für jeweils 5 min in Xylol getränkt. Die Rehydrierung ins wässrige Milieu wurde anschließend über eine absteigende Ethanolreihe erreicht. Dazu wurden die Schnitte zweimal für je 30 s zunächst in 100%igen, dann in 96%igen und abschließend in 70%igen Alkohol belassen. Im Anschluss folgte die Überführung der Präparate für 5 min in eine Waschpufferlösung, die zur Minimierung der Hintergrundfärbung beitragen sollte. Diese wurde durch die Verdünnung der TBST-Lösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 angesetzt. Die gebrauchsfertige Lösung bestand somit aus 0,05 mol/L Tris-HCL, 0,3 mol/L NaCl, 0,1% Tween 20 sowie 0,01% Konservierungsmittel pH 7,6. Zur Demaskierung der gewünschten Antigene erfolgte eine Mikrowellenbehandlung der Präparate. Diese diente der Renaturierung Formalin-bedingter „Maskierungen“ (Eiweißvernetzungen) einzelner Proteine. Dazu wurden die Schnitte in ein offenes, hitzestabiles Gefäß gestellt und anschließend mit entsprechendem Puffer aufgefüllt. Für die Färbungen mit Anti-Human HLA-DR und Anti-Human CD163 wurde dafür Zitratpuffer (pH 6) und für Anti-Human CD68 ein Tris/EDTA-Puffer (pH 9) als Epitopdemaskierungslösung verwendet. Die gebrauchsfertigen Lösungen wurden zuvor durch Verdünnung der genannten Konzentrate mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 hergestellt. Dieser Ansatz wurde anschließend für ca. 30 min auf etwa 95 °C in der Mikrowelle erhitzt. Es folgte eine Abkühlung auf Raumtemperatur über ca. 30 min und die erneute Überführung der Präparate in TBST-Lösung bis zum Zeitpunkt des eigentlichen Färbeprozesses. Dieser erfolgte automatisiert mit Hilfe des Gerätes „Dako Autostainer Plus“ nach der bereits beschriebenen ABC-Methode unter Verwendung des CSA-Systems. Bei jedem Färbeverfahren wurden gleichzeitig jeweils eine Positiv- und Negativ-Kontrolle mitgeführt, um Artefakte und Fehlfärbungen ausschließen zu können. Die Teilschritte der Färbetechnik beinhalteten die Reagenzien in festgelegter Reihenfolge: Als erster Schritt

erfolgte die Blockierung endogener Avidin-bindender Aktivität durch sequenzielle Applikation von Avidin und Biotin (Biotin Blocking System) für jeweils 10 min. Als Nächstes wurden die Proben für 10 min mit Peroxidase-Block inkubiert, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren und für weitere 5 min mit einem Proteinblock, um eine nicht-spezifische Bindung nachfolgender Reagenzien zu unterdrücken. Anschließend wurden die Proben für 15 min mit dem jeweiligen primären Maus-Antikörper bzw. Antibody-Diluent als Reagenz zur Negativkontrolle inkubiert. Es folgten Inkubationen mit biotinyliertem Link-Antikörper (10 min), Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (10 min), Amplifikationsreagenz (5 min) und Streptavidinperoxidase (10 min). Anschließend wurden die Präparate für 5 min mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) inkubiert. Als letzte Schritte schlossen sich die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 min und das Bläuen in Leitungswasser für weitere 5 min an. Das detaillierte Färbeprotokoll ist Tabelle 7 zu entnehmen. Nach Beendigung des automatischen Färbeverfahrens wurden die Proben kurz in TBST-Lösung getränkt, bevor die Entwässerung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe erfolgte. Dazu wurden die Schnitte zweimal für jeweils 30 s zunächst in 70%igem, dann 96%igem und anschließend in 100%igem Alkohol geschwenkt. Es folgte eine zweimalige Inkubation für jeweils 5 min in Xylol. Abschließend wurden die Präparate unter Verwendung des nicht-wässrigen Eindeckmediums „Entellan“ mit einem Deckglas versehen.

Tabelle 7: Färbeprotokoll der Immunhistochemie

Schritt	Reagenz	Zeit (in min)
1	Avidin-Block	10
2	Biotin-Block	10
3	Peroxidase-Block	10
4	Proteinblock	5
5	primärer Antikörper	15
6	Link-Antikörper	10
7	Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	10
8	Amplifikationsreagenz	5
9	Streptavidinperoxidase	10
10	DAB	5
11	Hämatoxylin	10
12	Leitungswasser	5

4.2.4 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Quantifizierung der Mikrogliaknötchen

Die mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitte wurden mikroskopisch bei 12,5-facher Vergrößerung hinsichtlich der Anzahl an Mikrogliaknötchen analysiert. Als sogenannte „Knötchen“ wurden dabei Cluster bestehend aus mindestens 10 zusammenhängenden mikroglialen Zellen definiert. Die Auswertung erfolgte manuell und blind in Bezug auf die Gruppeneinteilung sowie klinischen Angaben.

4.2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Quantifizierung der Mikrogliaknötchen

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden ebenfalls mittels Lichtmikroskopie bei 12,5-facher Vergrößerung hinsichtlich der Anzahl sowie der genauen Lokalisation der Mikrogliaknötchen analysiert. Dabei wurden sowohl die Gesamtzahl als auch die Verteilung der Mikrogliaknötchen auf die einzelnen Strukturen innerhalb der Medulla oblongata registriert. Die Auswertung erfolgte gleichfalls manuell und blind in Bezug auf die Gruppeneinteilung sowie klinischen Angaben.

Morphometrische Bestimmung der Mikrogliaadichte

Für die CD68 und HLA gefärbten Schnitte erfolgte eine quantitative Auswertung der diffusen mikroglialen Aktivität anhand morphometrischer Methoden. Alle histologischen Schnitte wurden dabei mittels Hellfeld-Lichtmikroskopie (Leica, DM 2500) blind in Bezug auf die Gruppeneinteilung und klinischen Angaben analysiert. Zu diesem Zweck erfolgte eine digitale Dokumentation der Schnitte (Nikon, DS Camera Head), wobei jeweils 10 Bilder bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Um regionale Unterschiede aufzudecken, wurden innerhalb der Medulla oblongata fünf funktionell unterschiedliche Regionen definiert, von denen sowohl die rechte als auch die linke Seite mit jeweils einem Bild erfasst wurden (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 1).

Tabelle 8: Regionen der Medulla oblongata

Bild	Region
a	Pyramidenbahn links
b	Pyramidenbahn rechts
c	Olive links
d	Olive rechts
e	olivocerebellare Fasern links
f	olivocerebellare Fasern rechts
g	Tractussolitarius links
h	Tractussolitarius rechts
i	Kerne Rautengrube links
j	Kerne Rautengrube rechts

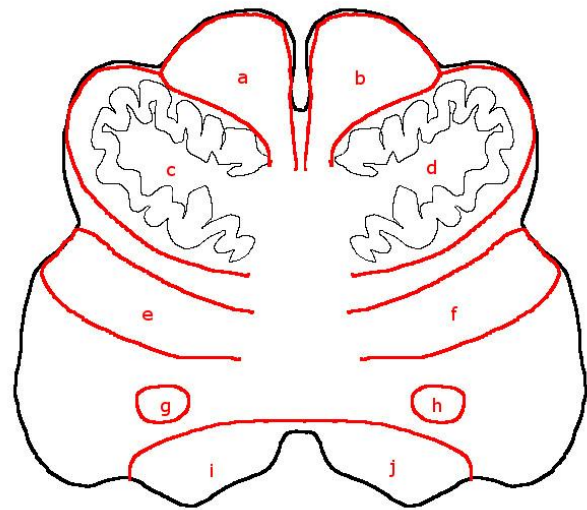


Abbildung 1: Skizze der Medulla oblongata

Die Mikroskopbilder wurden anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ Version 1.41 (entwickelt von Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) analysiert. Dabei wurde zunächst in jedem Bild eine sogenannte „area of interest“ (AOI) zwischen 0,1 und 0,3 mm² definiert (vgl. Abbildung 2/Abbildung 3). Um eine repräsentative Auswertung der diffusen Hintergrundaktivität zu ermöglichen, erfolgte die Festlegung der AOI anhand bestimmter Kriterien. So wurden beispielsweise größere Gefäße, Artefakte im Gewebe und Mikrogliaknötchen bewusst ausgeschlossen.

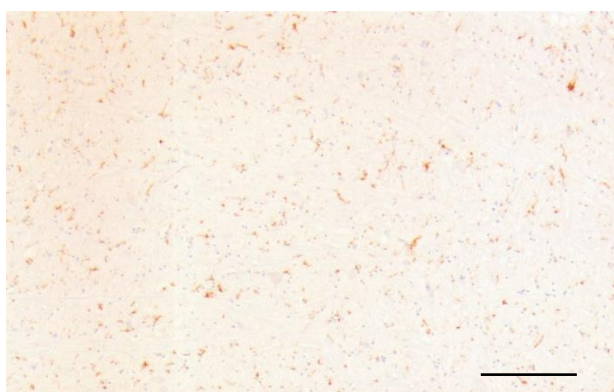


Abbildung 2: Histologisches Bild der Medulla oblongata, HLA (Messbalken 200 µm)



Abbildung 3: Festlegung der „area of interest“ für Abbildung 2

Innerhalb der AOI wurden die immunpositiven Zellen teilautomatisch ausgezählt und im Anschluss die durchschnittliche Zelldichte berechnet. Dabei unterschied man zwischen ramifizierten („ruhenden“) und amoeboiden („aktivierten“) Mikroglia (vgl. Abbildung 4). Die Zelldichte wurde ausgedrückt als Zahl der markierten Zellen pro Quadratmillimeter der gemessenen AOI. Angeschnittene Zellen wurden dabei nicht berücksichtigt.

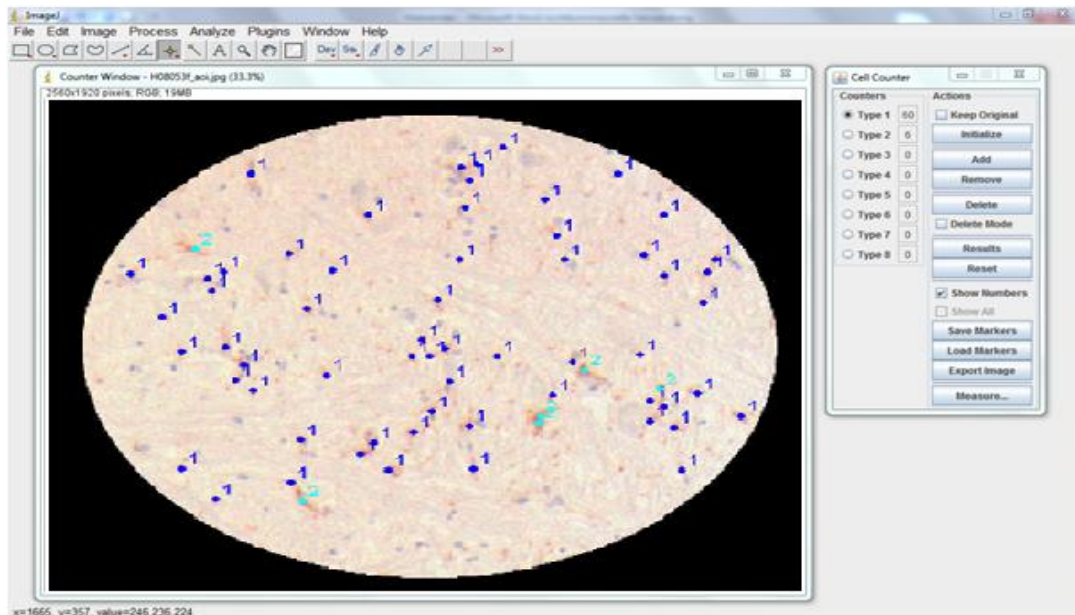


Abbildung 4: Cell Counting, ImageJ (1- ramifizierte Mikroglia, 2- amoeboid Mikroglia)

4.2.6 Statistische Analyse

Die erhobenen Messdaten (Zelldichte und Anzahl an Mikrogliaknötchen) wurden mit Hilfe des Kolmogorov–Smirnov Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. Da diese nicht festgestellt werden konnte, wurden als nichtparametrische Testverfahren einerseits der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zum statistischen Vergleich von zwei verbundenen Stichproben (HE- vs. HLA-Färbung) und andererseits der Mann-Whitney-U Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben (Mikroglia-Gruppe vs. Kontrollgruppe) gewählt. Darüber hinaus wurde der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrisches Testverfahren zum Vergleich mehrere unabhängige Stichproben (z.B. Einteilung nach Alzheimer und/oder Sepsis) angewandt. Zur Darstellung von Korrelationen erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Sensitivität und Spezifität wurden anhand von Kreuztabellen berechnet.

Für die statistische Analyse der Daten wurde SPSS Version 22.0 für Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Dabei galt ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant, ein p-Wert kleiner 0,01 als statistisch hoch signifikant und ein p-Wert kleiner 0,001 als statistisch höchst signifikant.

5 Ergebnisse

Die vorliegende Studie wurde von der Ethik-Kommission der FSU Jena geprüft und genehmigt (Bearbeitungsnummer: 3956-12/13). Alle Patienten bzw. deren Angehörige stimmten der Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke zu.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 860 Schnitte am Mikrotom angefertigt, von denen letztlich 86 HE-Färbungen sowie 258 immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurden. Die Quantifizierung und Lokalisationsanalyse der Mikrogliaknötchen erfolgte an 172 histologischen Präparaten. Für morphometrische Untersuchungen wurden 1720 Bilder aufgenommen und ausgewertet.

5.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2012 wurden insgesamt 707 Hirnsektionen am Institut für Pathologie der FSU Jena durchgeführt, darunter waren 464 (66%) der Fälle männlichen und 243 (34%) weiblichen Geschlechts. Bei Beurteilung der Routine-HE-Färbungen konnten bei 40 Patienten, darunter 25 männliche und 15 weibliche Personen, Mikrogliaknötchen festgestellt werden, woraus sich eine Häufigkeit von ca. 6% errechnet. Der Altersdurchschnitt des Patientenkollektivs betrug 65,6 Jahre. In 31 der 40 (78%) Fälle waren die Mikrogliaknötchen dabei im Bereich der Medulla oblongata lokalisiert (vgl. Abbildung 5). So erschien es gerechtfertigt, sich für ein ökonomisches Screening bei allen weiteren Untersuchungen auf die Hirnregion der Medulla oblongata zu beschränken.

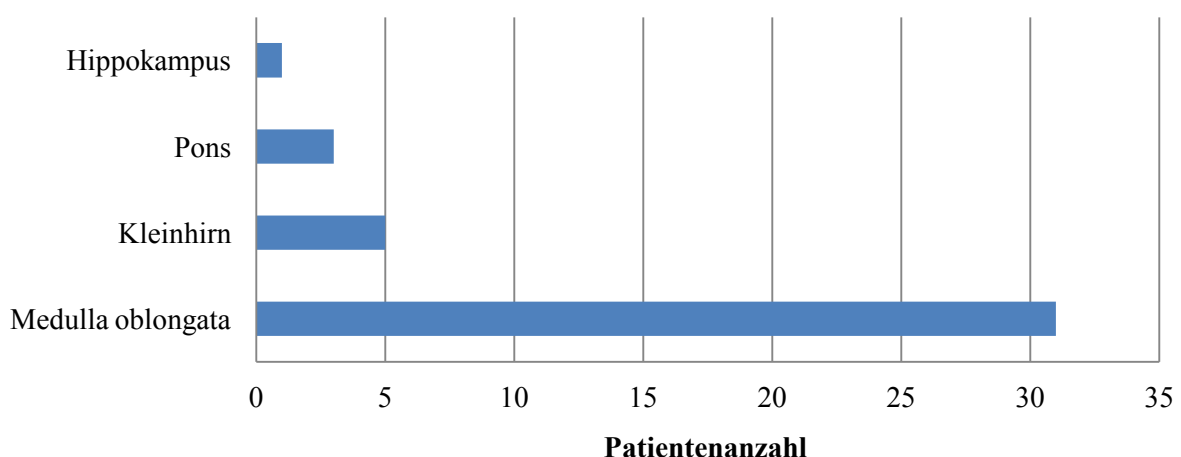


Abbildung 5: Hirnregionen mit Mikrogliaknötchen in der HE-Färbung

Die Fallgruppe („Mikroglia-Gruppe“) bestand somit aus 31 Patienten, darunter 20 (65%) männlichen und 11 (35%) weiblichen Geschlechts, und der Altersdurchschnitt betrug 66,9 Jahre. Zu diesen 31 Patienten mit Mikrogliaknötchen in der Medulla oblongata wurde eine nach Alter und Geschlecht angepasste Kontrollgruppe gebildet, bei der ebenfalls die Medulla oblongata untersucht wurde, aber in der Routine-HE-Färbung keine Mikrogliaknötchen festgestellt werden konnten. Bei den Kontrollen handelte es sich um 55 Patienten, von denen 36 (65%) männlichen und 19 (35%) weiblichen Geschlechts waren. Das durchschnittliche Alter lag bei 67,5 Jahren. Die demographischen Merkmale von Mikroglia- und Kontrollgruppe sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Hinsichtlich Alter (t-Test: $p=0,824$) und Geschlecht (Chi²-Test: $p=0,930$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 9: Demographische Übersicht über Mikroglia- und Kontrollgruppe

	Mikroglia-Gruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	31	55
Alter [in Jahren]	66,9 (31 – 81)	67,5 (30 – 89)
Geschlecht [m : w]	20 : 11 (65% : 35%)	36 : 19 (65% : 35%)

Auch zentralnervöse Begleiterkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer oder zerebrale Ischämien, waren in beiden Gruppen ähnlich verteilt (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht über Begleiterkrankungen

Begleiterkrankungen	Mikroglia-Gruppe	Kontrollgruppe
Morbus Alzheimer	11	9
Ischämie	11	6
Toxische Enzephalopathie	3	3
Hirnödem	2	0
Glioblastom	1	0
Amyotrophe Lateralsklerose	0	1

5.2 Korrelation der Mikrogliaknötchen mit klinischen und autoptischen Befunden

5.2.1 Mikrogliaknötchen und klinischer Verdacht auf Sepsis

Nach dem Studium der vorliegenden klinischen Angaben zeigte sich, dass bei 25 von 31 (81%) Patienten der Mikroglia-Gruppe auch klinisch der Verdacht auf eine Sepsis bestand. Bei 6 (19%) der Patienten mit Nachweis von Mikrogliaknötchen im Gehirn, bestand klinisch allerdings kein Verdacht auf eine Sepsis. Darüber hinaus konnten bei 43 von 55 (78%) Patienten der Kontrollgruppe auch anhand der klinischen Angaben keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Sepsis ermittelt werden, während bei 12 (22%) der Patienten ohne Mikrogliaknötchen klinisch der Verdacht auf eine Sepsis bestand. Basierend auf dem klinischen Sepsis-Verdacht besitzt der Nachweis von Mikrogliaknötchen somit eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 88% (vgl. Tabelle 11 und Abbildung 6).

Tabelle 11: Mikrogliaknötchen und klinischer Verdacht auf Sepsis

		klinischer Verdacht auf Sepsis		Gesamt
		Ja	Nein	
Mikroglia-knötchen	Ja	n=25 (81%)	n=6 (19%)	n=31 (100%)
	Nein	n=12 (22%)	n=43 (78%)	n=55 (100%)
		Sensitivität: 68 %	Spezifität: 88%	

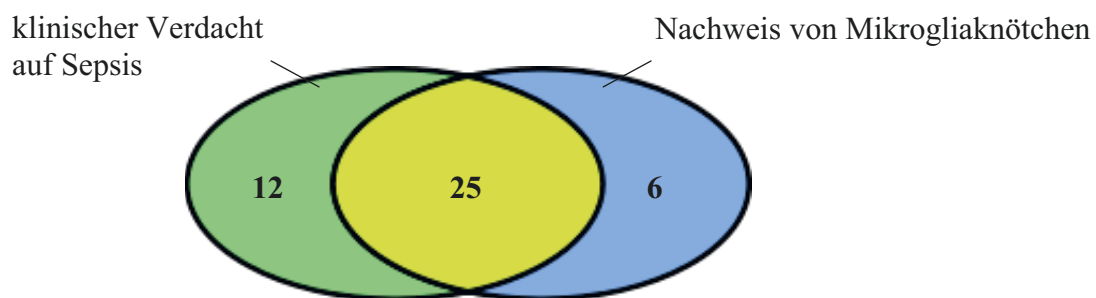


Abbildung 6: Mikrogliaknötchen und klinischer Verdacht auf Sepsis

5.2.2 Mikrogliaknötchen und autoptischer Verdacht auf Sepsis

Bei 23 der 31 (74%) Patienten mit Mikrogliaknötchen bestätigte auch der Obduktionsbefund den Verdacht auf eine Sepsis. Bei den übrigen 8 (26%) Patienten fanden sich hingegen keine morphologischen Hinweise für eine Sepsis. In der Kontrollgruppe ergab die Obduktion bei 44 der 55 (80%) Patienten ebenfalls keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Sepsis, während bei 11 (20%) der Patienten ohne Mikrogliaknötchen im Rahmen der Autopsie eine

Sepsis diagnostiziert worden war. Bezogen auf die autoptisch gestellte Sepsisdiagnose erreicht der Nachweis von Mikrogliaknötchen somit eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 85% (vgl. Tabelle 12 und Abbildung 7).

Tabelle 12: Mikrogliaknötchen und autoptischer Verdacht auf Sepsis

		autoptischer Verdacht auf Sepsis		Gesamt
		Ja	Nein	
Mikroglia-knötchen	Ja	n=23 (74%)	n=8 (26%)	n=31 (100%)
	Nein	n=11 (20%)	n=44 (80%)	n=55 (100%)
		Sensitivität: 68%	Spezifität: 85%	

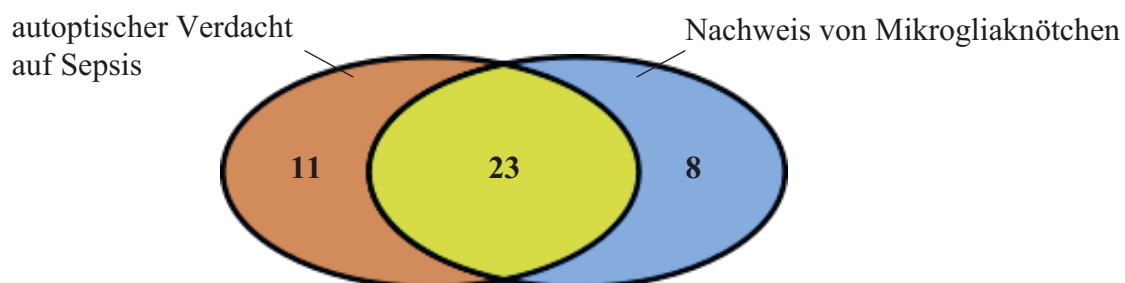


Abbildung 7: Mikrogliaknötchen und autoptischer Verdacht auf Sepsis

5.2.3 Klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis

Anhand der erhobenen Daten konnte festgestellt werden, dass bei 28 der 34 (82%) Patienten mit autoptischen Hinweisen für eine Sepsis, auch klinisch der Verdacht auf eine Sepsis bestand. Sechs (18%) der Patienten mit Sepsis-assoziierten morphologischen Befunden waren hingegen klinisch unauffällig. Bei 43 der 52 (83%) Patienten ohne nachweisbare morphologische Korrelate im Rahmen der Obduktion bestand auch klinisch kein Verdacht auf Sepsis, während bei 9 (17%) Patienten ohne autoptische Anhaltspunkte auf das Vorliegen einer Sepsis zuvor klinisch die Diagnose einer Sepsis gestellt worden war. Basierend auf dem klinischen Sepsis-Verdacht erreicht die autoptisch gestellte Sepsisdiagnose somit eine Sensitivität von 76% und eine Spezifität von 88% (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 8).

Tabelle 13: Klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis

		klinischer Verdacht auf Sepsis		Gesamt
		Ja	Nein	
autoptischer Verdacht auf Sepsis	Ja	n=28 (82%)	n=6 (18%)	n= 34 (100%)
	Nein	n=9 (17%)	n=43 (83%)	n= 52 (100%)
		Sensitivität: 76%	Spezifität: 88%	

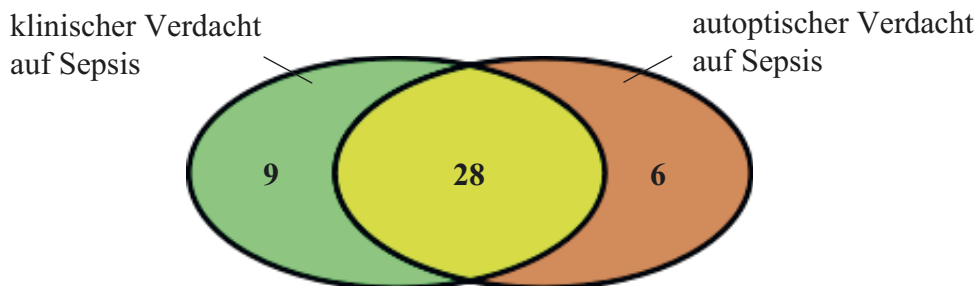


Abbildung 8: Klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis

5.2.4 Mikrogliaknötchen und klinischer sowie autoptischer Verdacht auf Sepsis

Die Zusammenschau der klinischen, autoptischen und neuropathologischen Befunde ergab, dass bei 20 von 31 (65%) Patienten der Mikroglia-Gruppe sowohl klinisch der Verdacht auf eine Sepsis bestand, als auch morphologische Hinweise für eine Sepsis gefunden werden konnten. Bei 5 (16%) der Patienten mit Mikrogliaknötchen im Gehirn bestanden laut Obduktionsbefund keine Anhaltspunkte für eine Sepsis, während klinisch der Verdacht auf das Vorliegen einer solchen geäußert worden war. Darüber hinaus konnten bei 3 (10%) weiteren Patienten der Mikroglia-Gruppe morphologische Hinweise für eine Sepsis gefunden werden, während klinisch kein Verdacht auf Sepsis bestand. Insgesamt konnte lediglich bei 3 der 31 (10%) Patienten mit Mikrogliaknötchen weder klinisch noch autoptisch der Verdacht auf eine Sepsis bestätigt werden. Bei 40 von 55 (73%) Patienten der Kontrollgruppe bestand weder klinisch der Verdacht auf eine Sepsis, noch ergab die durchgeführte Obduktion Hinweise für das Vorliegen einer solchen. Demgegenüber sprachen bei 8 (15%) Patienten ohne Mikrogliaknötchen sowohl klinische als auch autoptische Befunde für eine Sepsis. Bei 4 (7%) Patienten der Kontrollgruppe bestand nur klinisch der Verdacht auf eine Sepsis, während bei 3 (5%) weiteren Patienten nur im Rahmen der Obduktion Hinweise für eine Sepsis gefunden wurden (vgl. Abbildung 9).

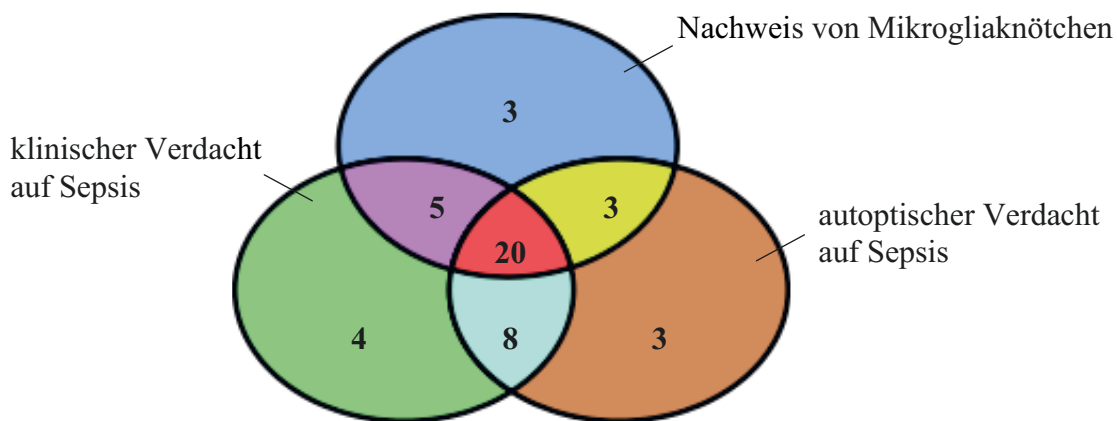


Abbildung 9: Mikrogliaknötchen, klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis

Zusammenfassend geben Tabelle 14 und Abbildung 10 einen Überblick über die Häufigkeiten der in den verschiedenen Befunden gestellten Diagnose bezüglich des Vorliegens einer Sepsis und deren Übereinstimmungen. Bei 40 der 86 (47%) Patienten konnten sowohl auf klinischer und allgemeinpathologischer Ebene als auch im Rahmen einer neuropathologischen Untersuchung keine Hinweise für ein septisches Geschehen gefunden werden. Hingegen wurde bei den übrigen 46 (53%) Patienten in mindestens einem der Befunde eine Sepsis beschrieben. Bei 20 (23%) dieser Patienten bestand zwischen klinischem, autoptischem und neuropathologischem Befund Einigkeit hinsichtlich der Diagnose Sepsis. Insgesamt stimmten somit bei 60 der 86 (70%) untersuchten Patienten die Befunde aller drei Fachdisziplinen überein. In den restlichen 26 (30%) Fällen gab es Differenzen bezüglich der Einschätzung eines septischen Geschehens. Dabei deuteten bei 8 Patienten sowohl klinische Angaben als auch autoptische Befunde auf eine Sepsis hin, während jedoch keine Mikrogliaknötchen in der Medulla oblongata nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 14: Übereinstimmung von klinischen, autoptischen und neuropathologischen Befunden bezüglich Sepsis ("+" positiv, "-" negativ, „MGK“- Mikrogliaknötchen)

MGK	klinisch Sepsis	autoptisch Sepsis	Anzahl [n]	Anteil in %
+	+	+	20	23,26
+	+	-	5	5,81
+	-	+	3	3,49
+	-	-	3	3,49
-	+	+	8	9,30
-	+	-	4	4,65
-	-	+	3	3,49
-	-	-	40	46,51

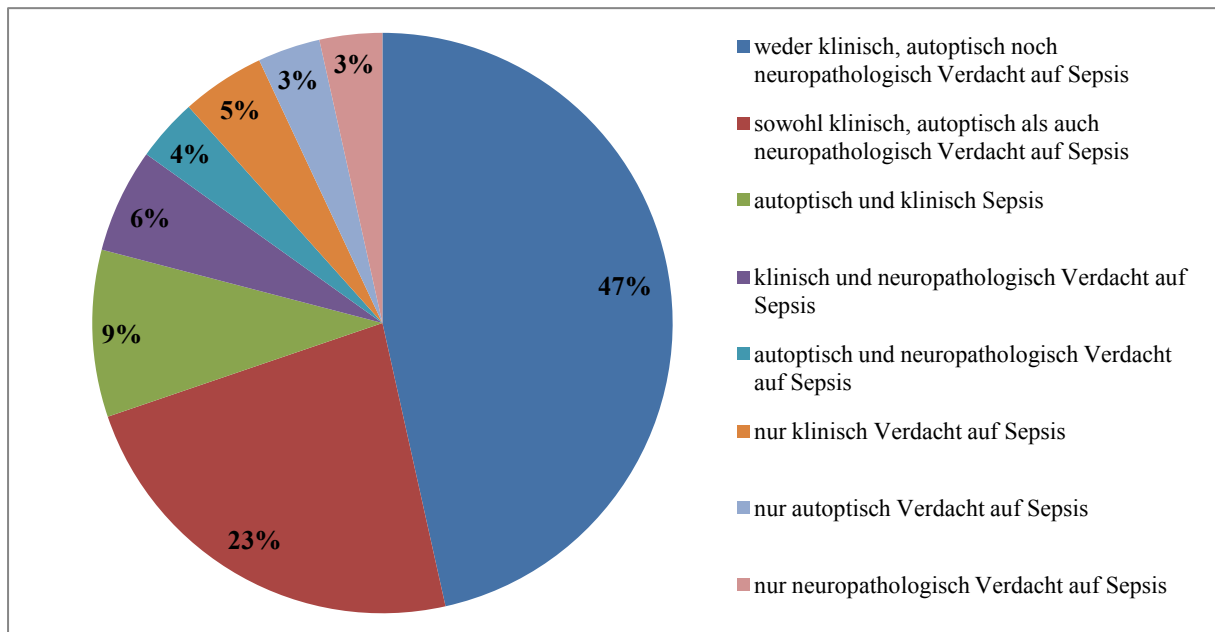


Abbildung 10: Übereinstimmung von klinischen, autoptischen und neuropathologischen Befunden bezüglich Sepsis

5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) zeigten die zur Orientierung wichtigen anatomischen Grundstrukturen, was insbesondere für die spätere Zuordnung der Mikrogliaknötchen zu den für die Untersuchung relevanten Regionen innerhalb der Medulla oblongata von Bedeutung war. Abbildung 11 zeigt beispielhaft ein Mikrogliaknötchen in der HE-Färbung im Bereich des Tractus solitarius.

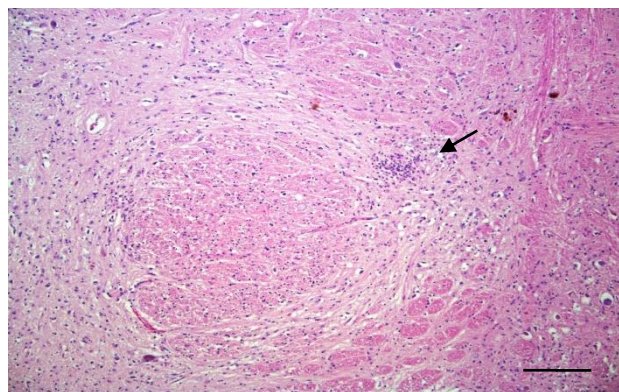


Abbildung 11: Mikrogliaknötchen (←), HE (Messbalken 200 µm)

Da Mikrogliaknötchen sehr klein sind, ist außerdem zu erwarten, dass auf tieferen Parallelschnitten die Mikrogliaknötchen unter Umständen nicht mehr nachzuweisen sind. Andererseits könnten bei zuvor negativen Fällen der Kontrollgruppe auf tieferen Schnittebenen letztlich doch Mikrogliaknötchen zum Vorschein kommen. Deshalb wurden

sämtliche Fälle neu geschnitten und in der HE-Färbung nochmals das Auftreten von Mikrogliaknötchen untersucht. Dabei waren bei 10 der 31 (32%) Patienten mit zuvor beschriebenen Mikrogliaknötchen diese auf den tieferen Schnittstufen der neu angefertigten Präparate nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten nunmehr bei 8 der 55 (15%) als Kontrollen eingestuft Patienten einzelne Mikrogliaknötchen gefunden werden. Bezogen auf den Nachweis von Mikrogliaknötchen in der initialen Routine-HE-Färbung erreicht der Nachweis von Mikrogliaknötchen auf den HE-Parallelschnitten somit eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 85% (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 15: Auftreten von Mikrogliaknötchen bei initialer Routine-Diagnostik und bei Kontrolluntersuchung auf tieferen Schnittstufen

		Mikrogliaknötchen in initialer Routine-HE-Färbung	
		Ja	Nein
Mikrogliaknötchen auf HE-Parallelschnitt	Ja	n=21 (68%)	n=8 (15%)
	Nein	n=10 (32%)	n=47 (85%)
Gesamt		n=31 (100%)	n=55 (100%)
		Sensitivität: 68%	Spezifität: 85%

Anhand der HE-Färbungen erfolgte darüber hinaus eine Quantifizierung der Mikrogliaknötchen, wobei die ursprüngliche Einteilung in Mikroglia- und Kontrollgruppe beibehalten wurde. Insgesamt variierte die im gesamten Patientenkollektiv (n=86) ermittelte Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen 0 und 8, wobei für die Mikroglia-Gruppe ein durchschnittlicher Wert von 2 und für die Kontrollgruppe ein Wert von 0,36 Mikrogliaknötchen pro Patient berechnet wurde. Der Unterschied hinsichtlich der Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe war dabei statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$) (vgl. Abbildung 12). In allen folgenden Boxplotdiagrammen werden dabei Werte außerhalb des 3-fachen Interquartilsabstandes als Extremwerte (*) und Werte zwischen dem 1,5- und 3-fachen Interquartilsabstandes als Ausreißer (°) definiert.

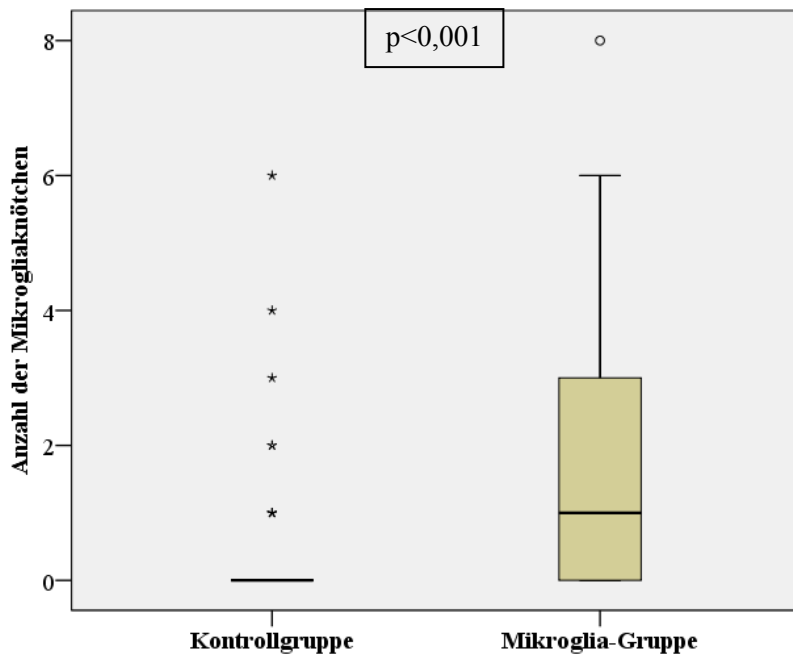


Abbildung 12: Vergleich der Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in der HE-Färbung (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

5.4 Immunhistochemische Färbungen

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen sollte das Auffinden von Mikrogliaknötchen erleichtert und dadurch überprüft werden, ob sich die Häufigkeit von Mikrogliaknötchen durch die Anwendung immunhistochemischer Methoden im Vergleich zur Routine-HE-Färbung als Goldstandard erhöht. Darüber hinaus wurde nach weiteren mikroglialen Reaktionsmustern gesucht, welche auf das Vorliegen einer Sepsis bzw. septischen Enzephalopathie hinweisen könnten. Die Färbung mit CD163 erwies sich bei kaum nachweisbarer positiver Reaktion dabei insgesamt als ungeeignet, so dass sich die folgenden Auswertungen auf die HLA- sowie die CD68-Färbungen beschränken.

5.4.1 Mikrogliaknötchen innerhalb der Medulla oblongata

Anhand der immunhistochemischen Färbungen erfolgte eine Quantifizierung der Mikrogliaknötchen und zusätzlich eine Analyse hinsichtlich ihres Verteilungsmusters innerhalb der Medulla oblongata. Die Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen beispielhaft ein Mikrogliaknötchen in der HLA- sowie in der CD68-Färbung. Dabei konnte eine deutlich kräftigere Reaktion der Mikrogliaknötchen bei Einsatz des HLA-Antikörpers festgestellt werden, weshalb die folgenden Auswertungen ausschließlich anhand der HLA-Färbungen erfolgten.

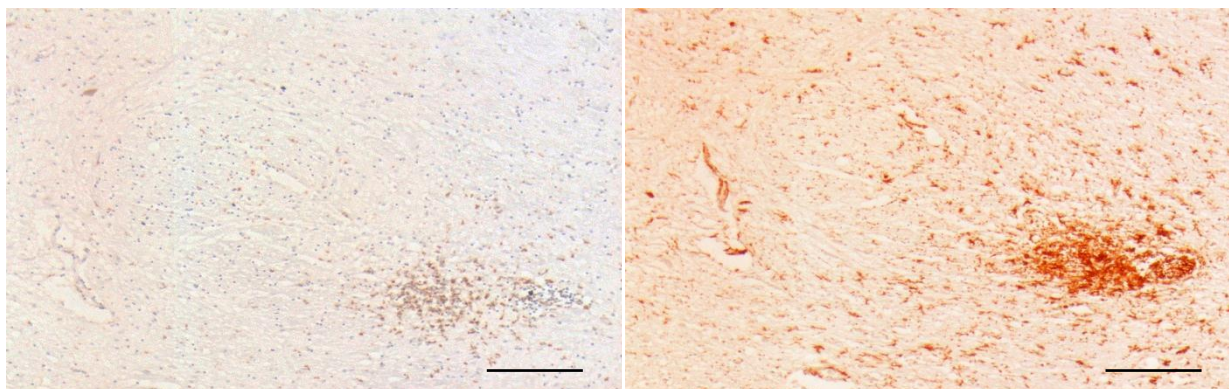


Abbildung 13: Mikrogliaknötchen, CD68 (Messbalken 200 µm)

Abbildung 14: Mikrogliaknötchen, HLA (Messbalken 200 µm)

Bei 27 von 31 (87%) Patienten der Mikroglia-Gruppe waren auch in der HLA-Färbung Mikrogliaknötchen nachweisbar. In lediglich 13% der Fälle konnten in der HLA-Färbung keine Mikrogliaknötchen gefunden werden. In der Kontrollgruppe hingegen war der Befund in der HLA-Färbung hinsichtlich des Auftretens von Mikrogliaknötchen nur bei 21 von 55 (38%) Patienten ebenfalls negativ, während in 62% der Fälle einzelne Mikrogliaknötchen identifiziert werden konnten. Hierbei handelte es sich allerdings bei der Mehrheit der Fälle um weniger als 4 Mikrogliaknötchen pro Patient. Basierend auf dem Nachweis von Mikrogliaknötchen in der initialen Routine-HE-Färbung besitzt der Nachweis von Mikrogliaknötchen in der HLA-Färbung somit eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 38% (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: Immunhistochemische Detektion von Mikrogliaknötchen im Vergleich zur initialen Routine-Diagnostik

		Mikrogliaknötchen in initialer Routine-HE-Färbung	
		Ja	Nein
Mikrogliaknötchen in HLA-Färbung	Ja	n=27 (87%)	n=34 (62%)
	Nein	n=4 (13%)	n=21 (38%)
Gesamt		n=31 (100%)	n=55 (100%)
		Sensitivität: 87%	Spezifität: 38%

Insgesamt variierte die Anzahl der Mikrogliaknötchen in der Medulla oblongata im gesamten Patientenkollektiv (n=86) zwischen 0 und 43, wobei in der Mikroglia-Gruppe durchschnittlich 9 und in der Kontrollgruppe 2 Mikrogliaknötchen pro Patient vorhanden waren. Die Unterschiede in der Anzahl der Mikrogliaknötchen zwischen beiden Gruppen waren dabei statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$) (vgl. Abbildung 15).

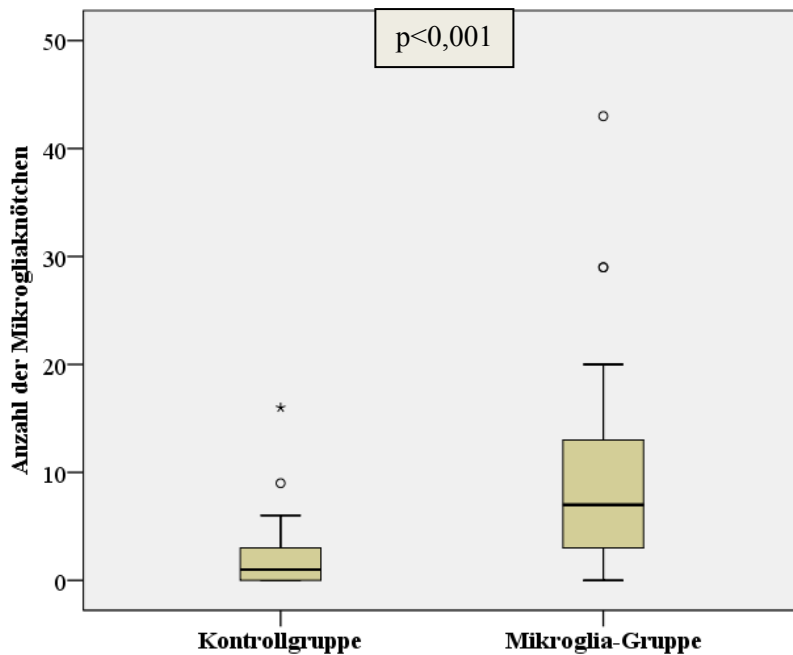


Abbildung 15: Vergleich der Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in der HLA-Färbung (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

Beim Vergleich der Anzahl detektierter Mikrogliaknötchen in HE- und immunhistochemischer Färbung (HLA) konnte sowohl für die Mikroglia- als auch die Kontrollgruppe eine deutlich höhere durchschnittliche Anzahl an Mikrogliaknötchen in der HLA-Färbung festgestellt werden. Dabei waren die Unterschiede hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen HLA- und HE-Färbung statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$) (vgl. Abbildung 16).

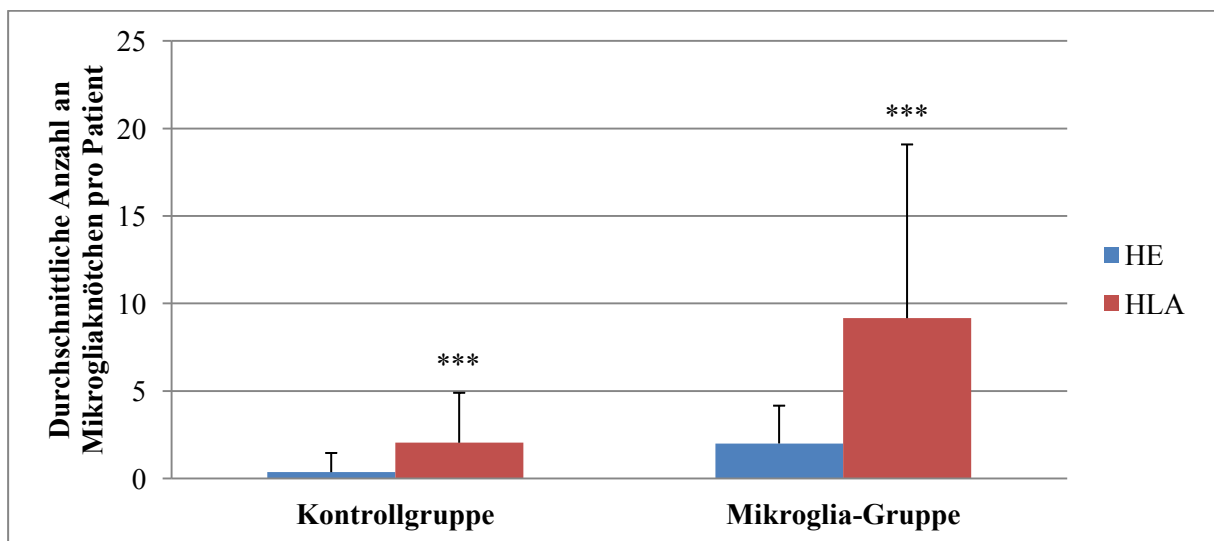


Abbildung 16: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Mikrogliaknötchen pro Patient in Mikroglia- und Kontrollgruppe zwischen HE- und HLA-Färbung (Fehlerbalken entspricht SD, *** entspricht $p < 0,001$)

Zusätzlich wurde anhand der HLA-Färbungen die Verteilung der Mikrogliaknötchen auf die verschiedenen Regionen innerhalb der Medulla oblongata untersucht und dabei ebenfalls zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe unterschieden. Dabei zeigte sich, dass in beiden Gruppen die Mehrzahl der Mikrogliaknötchen im Bereich der olivocerebellaren Fasern zu verzeichnen war, während die Pyramidenbahn nur vereinzelt Mikrogliaknötchen aufwies. Der Unterschied zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe bezüglich der Anzahl der Mikrogliaknötchen erreichte in den Regionen der Olive ($p=0,004$), der olivocerebellaren Fasern ($p<0,001$), des Tractus solitarius ($p=0,041$) sowie der Rautengrube ($p=0,008$) statistische Signifikanz (vgl. Abbildung 17).

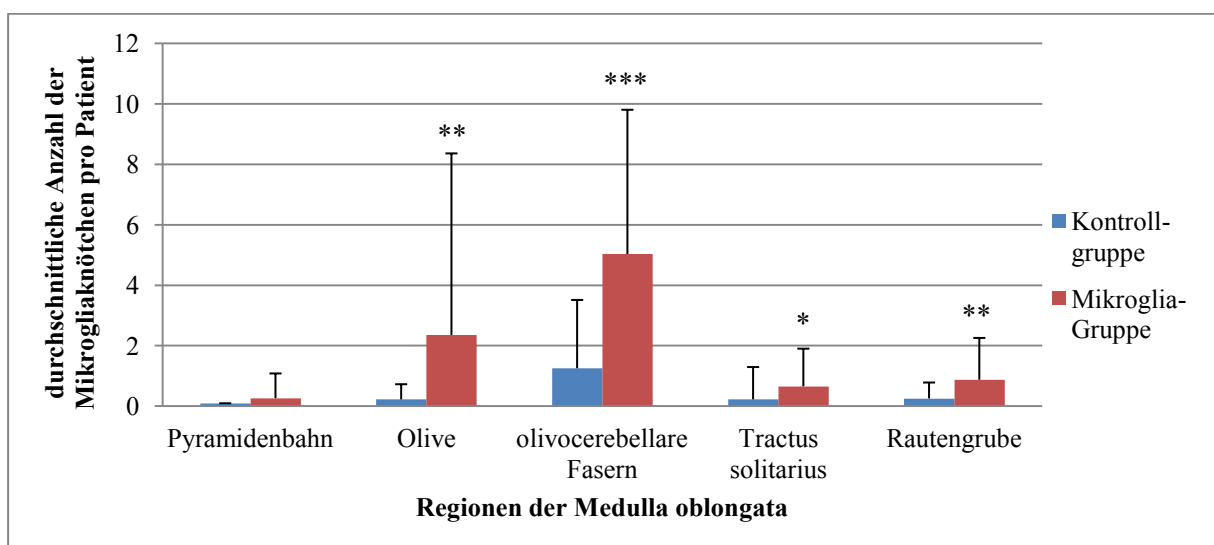


Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl an Mikrogliaknötchen pro Patient und untersuchter Region innerhalb der Medulla oblongata bei Mikroglia- und Kontrollgruppe (Fehlerbalken entspricht SD, * entspricht $p<0,05$, ** entspricht $p<0,01$, *** entspricht $p<0,001$)

5.4.2 Zelldichte immunpositiver Mikroglia in der Medulla oblongata

Die diffuse Ausbreitung der Mikroglia konnte mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen und morphometrischer Methoden zuverlässig bestimmt werden. Dabei erfolgte die Ermittlung der mikroglialen Zelldichte anhand der teilautomatischen Auswertung von jeweils 10 mikroskopischen Bildern pro Patient mit anschließender Bildung eines Durchschnittswertes.

5.4.2.1 Mikroglia-dichte in Mikroglia- und Kontrollgruppe

Die HLA- zeigte im Vergleich zur CD68-Färbung eine deutlich stärkere Reaktion der Mikroglia. Bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv ($n=86$) konnte eine etwa um den Faktor 4 (Quotient der Mittelwerte: 3,92) erhöhte durchschnittliche Mikroglia-dichte in der HLA- (421 Zellen pro mm^2) gegenüber der CD68-Färbung (107 Zellen pro mm^2) festgestellt werden. Abbildung 18 veranschaulicht die unterschiedliche Mikroglia-dichte in Mikroglia- und

Kontrollgruppe in Abhängigkeit der angewandten immunhistochemischen Färbung. Dabei wurden in der Mikroglia-Gruppe durchschnittliche Dichtewerte von 378 Zellen/mm² (HLA) bzw. 151 Zellen/mm² (CD68) ermittelt, während die Werte in der Kontrollgruppe bei 446 Zellen/mm² (HLA) bzw. 83 Zellen/mm² (CD68) lagen.

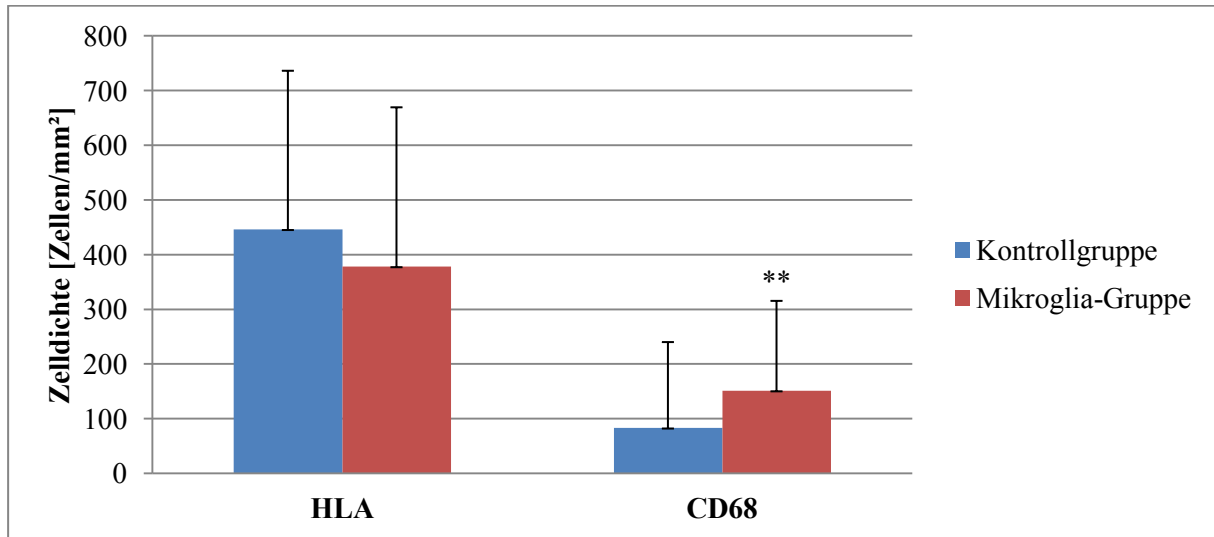


Abbildung 18: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in HLA- und CD68-Färbung (Fehlerbalken entspricht SD, ** entspricht $p < 0,01$)

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Mikroglia-dichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe zeigte sich hierbei nur in der CD68-Färbung ($p = 0,009$) (vgl. Abbildung 19, Abbildung 20 und

Abbildung 22), nicht aber in der HLA-Färbung ($p = 0,235$) (vgl. Abbildung 21).

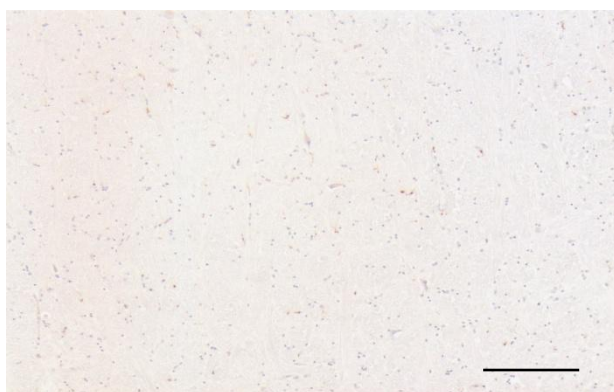


Abbildung 19: Kontrollgruppe, CD68 (Messbalken 200 μm)

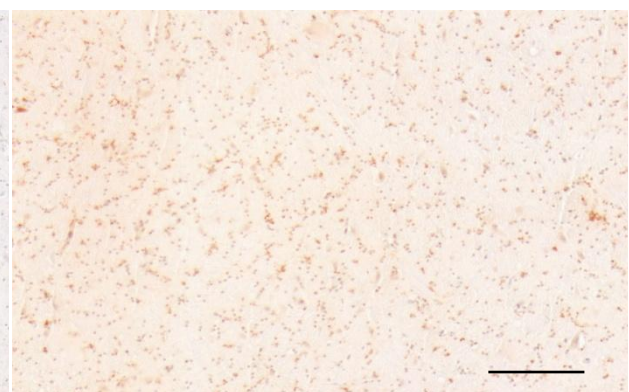


Abbildung 20: Mikroglia-Gruppe, CD68 (Messbalken 200 μm)

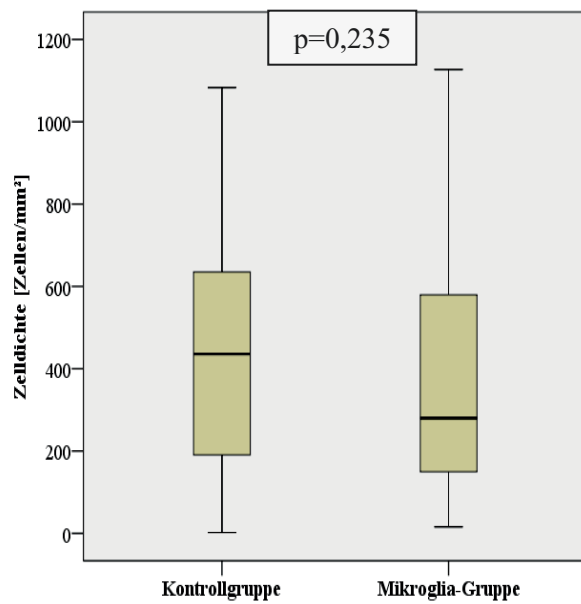


Abbildung 21: Vergleich der Mikroglialdichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA

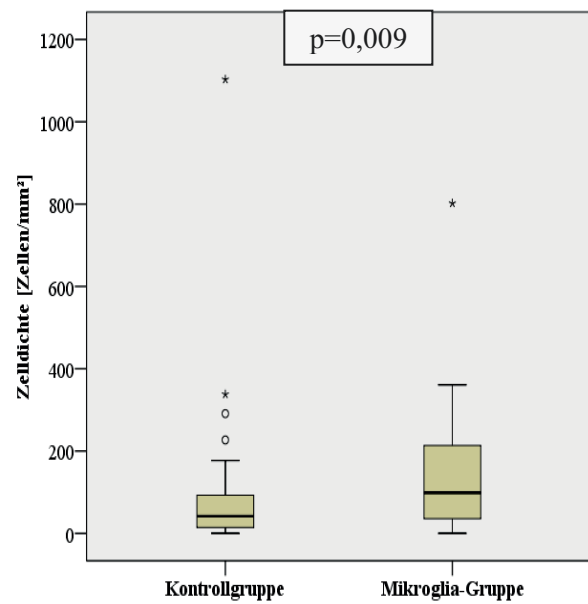


Abbildung 22: Vergleich der Mikroglialdichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

5.4.2.2 Mikroglialdichte bei klinischem Verdacht auf Sepsis

Aus den klinischen Angaben ging hervor, dass bei 37 Patienten bereits zum Zeitpunkt des Versterbens der Verdacht auf eine Sepsis geäußert worden war, während bei 49 Patienten keine Hinweise auf eine Sepsis bestanden (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Patientenkollektiv mit klinischem Verdacht auf Sepsis

	klinische Sepsisgruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	37	49
Alter [Jahren]	66,2 (34 – 82)	68,1 (30 – 89)
Geschlecht [m : w]	21 : 16	35 : 14

Auch hierbei zeigt sich in der CD68-Färbung ein signifikanter Unterschied in der Mikroglialdichte zwischen klinischer Sepsis- und Kontrollgruppe ($p=0,002$) (vgl. Abbildung 24), während in der HLA-Färbung die Differenz das Signifikanzniveau verfehlte ($p=0,264$) (vgl. Abbildung 23).

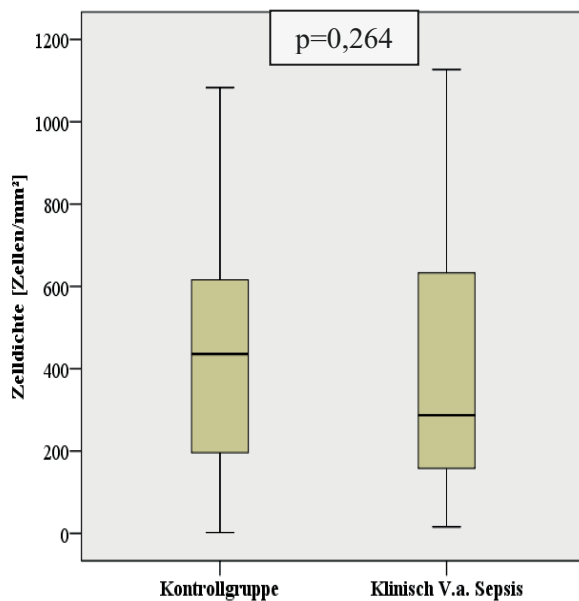


Abbildung 23: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen klinischer Sepsis- und Kontrollgruppe, HLA

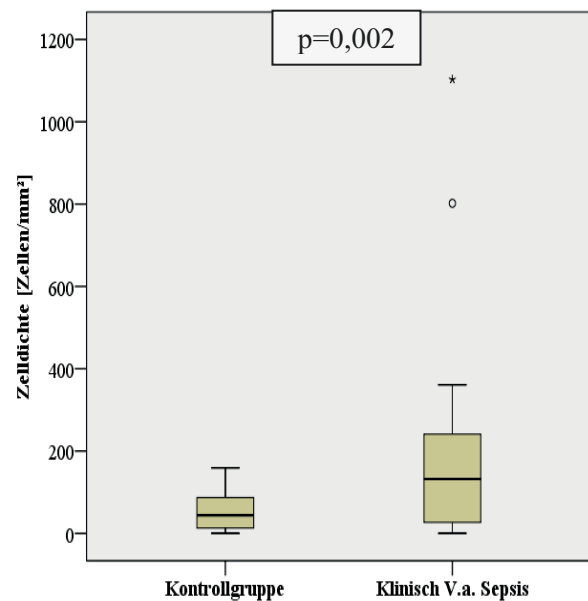


Abbildung 24: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen klinischer Sepsis- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

5.4.2.3 Mikroglia-dichte bei autoptischem Verdacht auf Sepsis

Anhand der Sektionsbefunde ergab sich postmortal bei 34 Patienten der Verdacht auf eine Sepsis, während bei 52 Patienten keine morphologischen Hinweise für das Vorliegen einer Sepsis gefunden werden konnten (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: Patientenkollektiv mit autoptischem Verdacht auf Sepsis

	autoptische Sepsisgruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	34	52
Alter [Jahren]	65,2 (31 – 80)	68,6 (30 – 89)
Geschlecht [m : w]	20 : 14	36 : 16

Hierbei erreichte der Unterschied in der Mikroglia-dichte zwischen autoptischer Sepsis- und Kontrollgruppe weder in der HLA- ($p=0,114$), noch in der CD68-Färbung ($p=0,052$) statistische Signifikanz (vgl. Abbildung 25 und Abbildung 26).

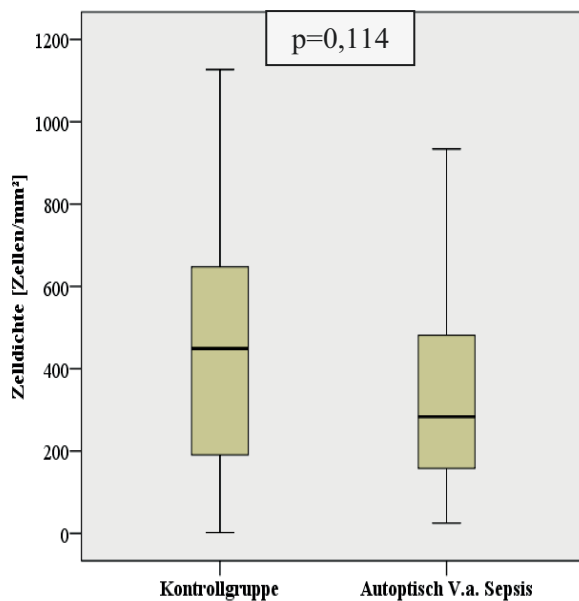


Abbildung 25: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen autoptischer Sepsis- und Kontrollgruppe, HLA

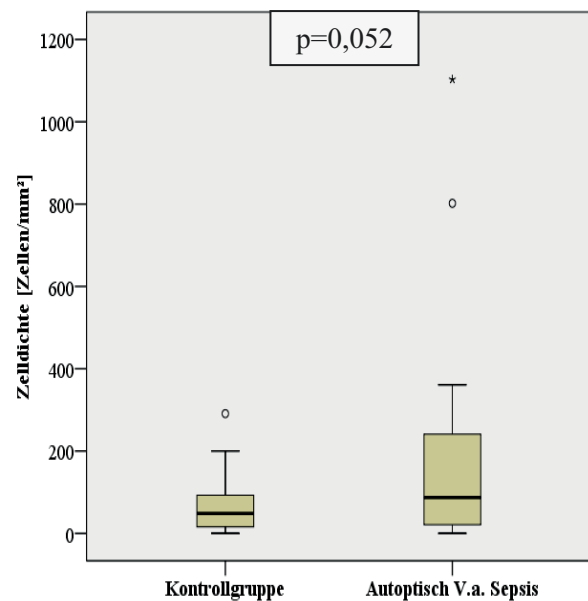


Abbildung 26: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen autoptischer Sepsis- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °-Ausreißer)

5.4.2.4 Mikroglia-dichte bei neuropathologischem, klinischem und autoptischem Verdacht auf Sepsis

Bei insgesamt 20 Patienten der Mikroglia-Gruppe bestand gleichzeitig sowohl klinisch als auch autoptisch der Verdacht auf eine Sepsis. Demgegenüber fanden sich insgesamt 40 Patienten der ursprünglichen Kontrollgruppe, bei denen weder klinisch noch autoptisch der Verdacht auf eine Sepsis bestand. Die folgende Gegenüberstellung beinhaltet somit die eindeutig richtig positiven und die eindeutig richtig negativen Fälle in Bezug auf das Vorliegen einer Sepsis (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Patientenkollektiv mit klinischem, autoptischem und neuropathologischem Verdacht auf Sepsis

	Sepsisgruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	20	40
Alter [Jahren]	64,4 (31 – 76)	67,5 (30 – 89)
Geschlecht [m : w]	13 : 7	29 : 11

Hierbei zeigte sich in der CD68-Färbung erneut ein signifikanter Unterschied in der Mikroglia-dichte zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe ($p=0,024$), während in der HLA-Färbung das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p=0,256$) (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 28).

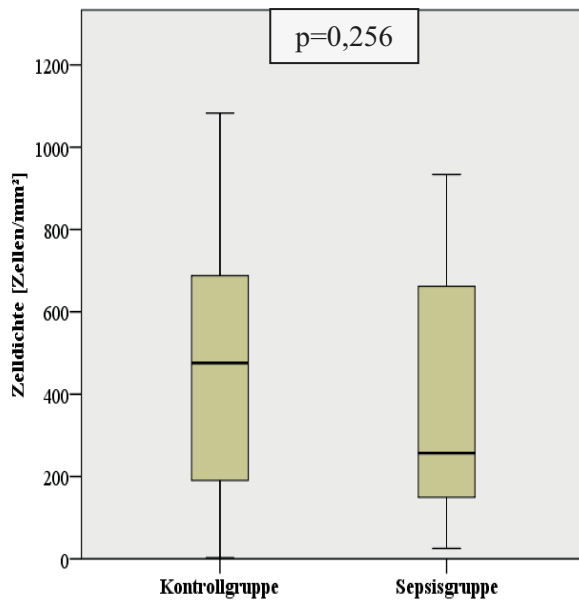


Abbildung 27: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe, HLA

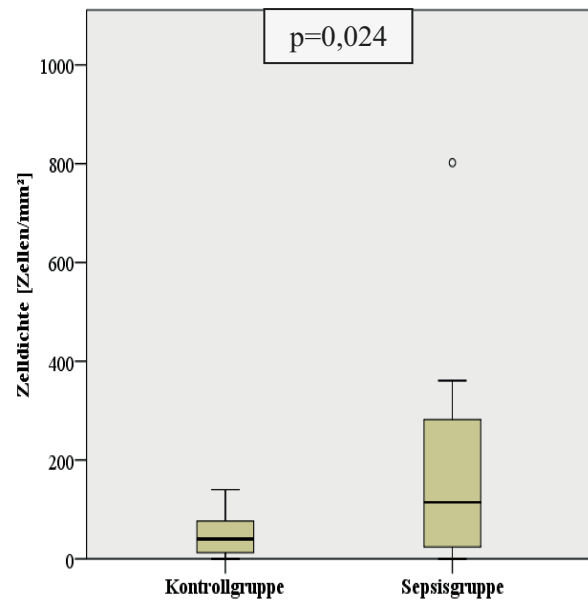


Abbildung 28: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe, CD68 (°- Ausreißer)

5.4.3 Zelldichte ramifizierter und amoeboider Mikroglia

Zusätzlich zur Berechnung der allgemeinen Mikroglia-dichte wurde anhand morphologischer Charakteristika zwischen ramifiziert und amoeboid konfigurierten Mikroglia unterschieden und mittels morphometrischer Methoden die Dichte der jeweiligen Zelltypen bestimmt. Dazu wurden in Mikroglia- und Kontrollgruppe je 10 Bilder pro Patient analysiert und anschließend ein Durchschnittswert gebildet. Die Abbildung 29 bis Abbildung 32 veranschaulichen die beiden morphologischen Zustände der Mikroglia sowohl in der HLA- als auch in der CD68-Färbung.

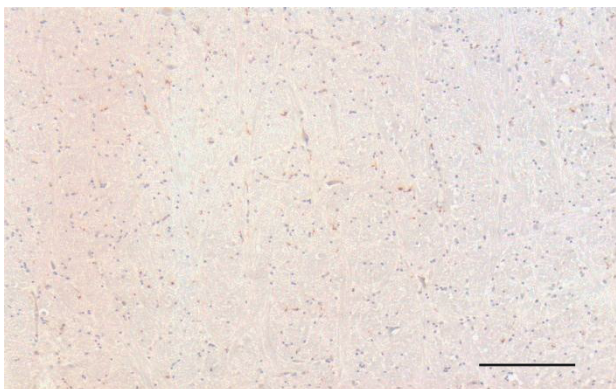


Abbildung 29: Ramifizierte Mikroglia, CD68 (Messbalken 200 µm)

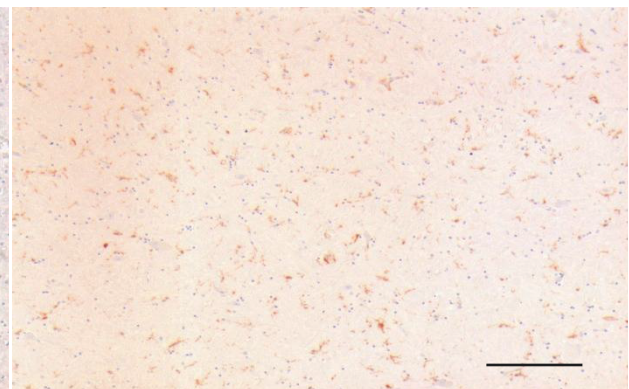


Abbildung 30: Ramifizierte Mikroglia, HLA (Messbalken 200 µm)

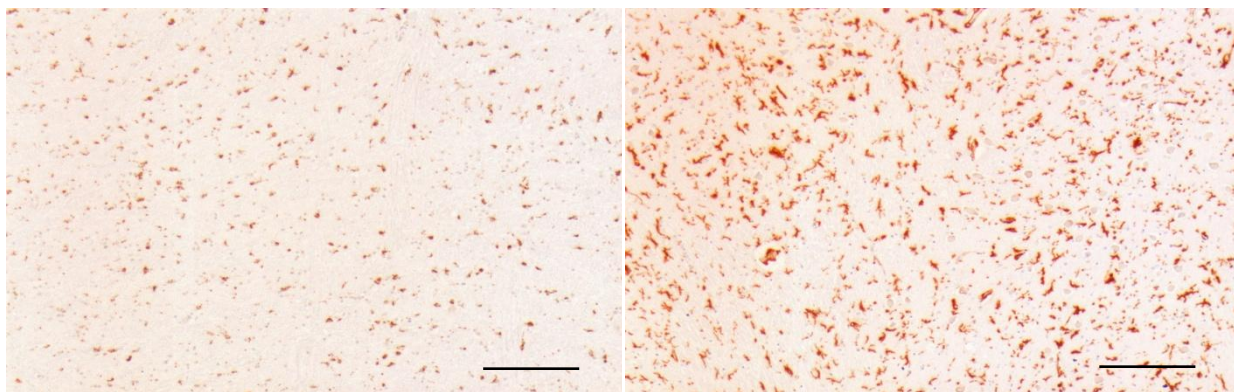


Abbildung 31: Amoeboide Mikroglia, CD68 (Messbalken 200 µm)

Abbildung 32: Amoeboide Mikroglia, HLA (Messbalken 200 µm)

Hierbei zeigte sich eine deutlich erhöhte durchschnittliche Zelldichte der ramifizierten im Vergleich zu den amoeboiden Mikroglia. In der HLA-Färbung lag dabei die durchschnittliche Zelldichte ramifizierter Mikroglia bei 278 Zellen/mm² und war damit etwa um den Faktor 2 höher als die Zelldichte amoeboider Mikroglia (141 Zellen/mm²). In der CD68-Färbung war die Zelldichte ramifizierter Mikroglia (88 Zellen/mm²) gegenüber der Dichte amoeboider Mikroglia (19 Zellen/mm²) sogar um den Faktor 4 erhöht (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 20: Durchschnittliche Zelldichte ramifizierter und amoeboider Mikroglia in HLA- und CD68-Färbung

	HLA	CD68
ramifiziert	278 Zellen/mm ²	88 Zellen/mm ²
amoeboid	141 Zellen/mm ²	19 Zellen/mm ²

Die Abbildung 33 und Abbildung 34 veranschaulichen die Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Zelldichten der ramifizierten und amoeboiden Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in beiden immunhistochemischen Färbungen. Dabei lag die durchschnittliche Dichte der ramifizierten Mikroglia in der Mikroglia-Gruppe bei 245 (HLA) bzw. 126 (CD68) Zellen/mm² und in der Kontrollgruppe bei 297 (HLA) bzw. 67 (CD68) Zellen/mm². Für die amoeboid konfigurierten Mikroglia wurden mittlere Dichtewerte in der Mikroglia-Gruppe von 129 (HLA) bzw. 25 (CD68) und in der Kontrollgruppe von 148 (HLA) bzw. 16 (CD68) Zellen/mm² gemessen.

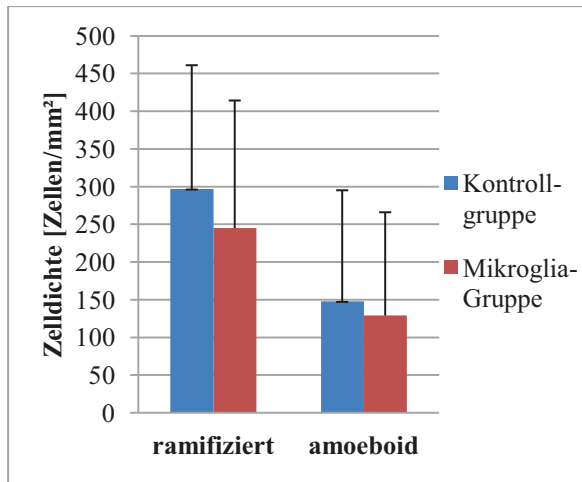


Abbildung 33: Zelldichte amoeboider und ramifizierter Mikroglia, HLA (Fehlerbalken entspricht SD)

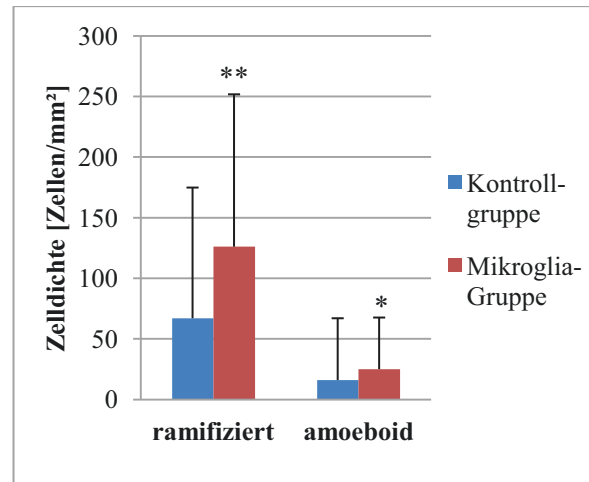


Abbildung 34: Zelldichte amoeboider und ramifizierter Mikroglia, CD68 (Fehlerbalken entspricht SD, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$)

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Zelldichte sowohl ramifizierter ($p=0,008$) als auch amoeboider ($p=0,016$) Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe zeigte sich hierbei nur in der CD68-Färbung (vgl. Abbildung 36 und Abbildung 38). In der HLA-Färbung konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede, weder in der Zelldichte ramifizierter ($p=0,141$), noch amoeboid konfiguriert Mikroglia ($p=0,461$) zwischen beiden Gruppen gefunden werden (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 37).

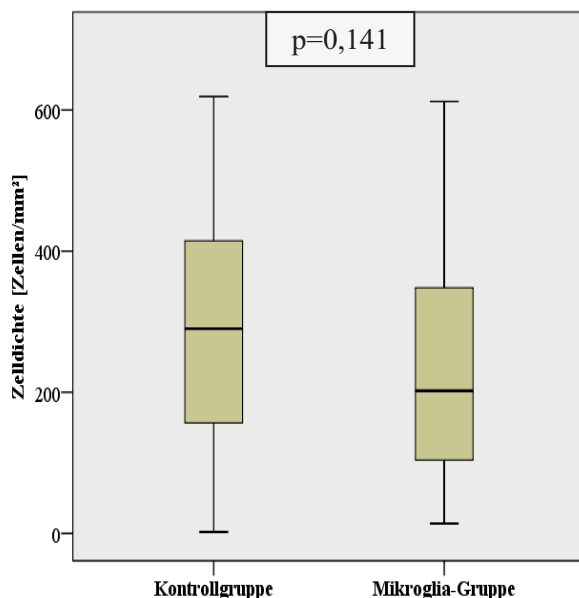


Abbildung 35: Vergleich der Zelldichten ramifizierter Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA

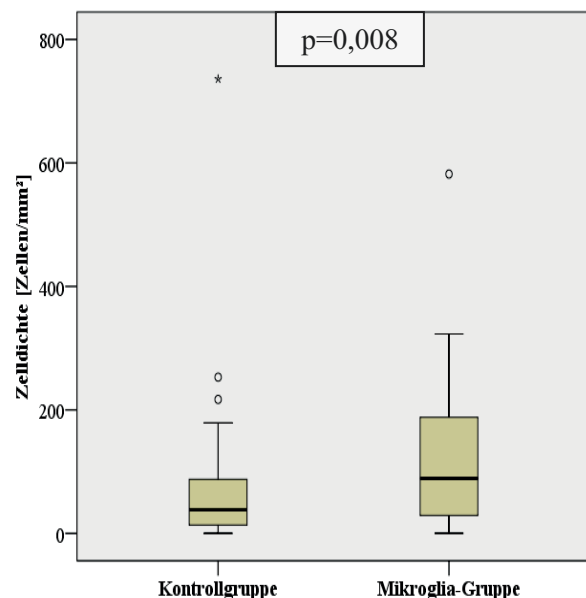


Abbildung 36: Vergleich der Zelldichten ramifizierter Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (*-Extremwerte, - Ausreißer)

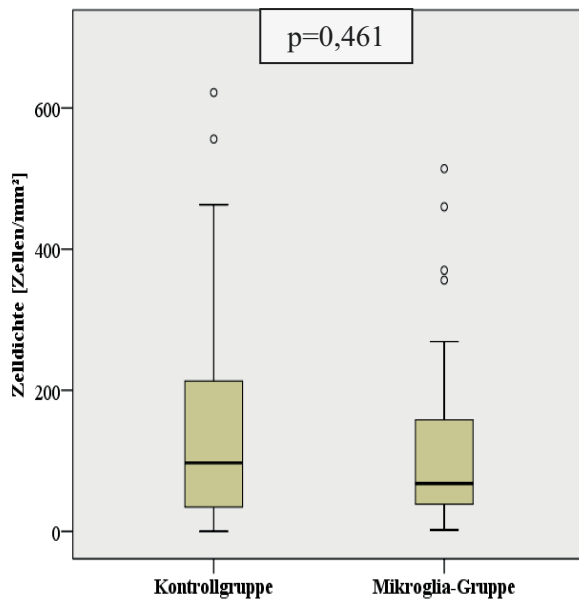


Abbildung 37: Vergleich der Zelldichten amoeboider Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA (°- Ausreißer)

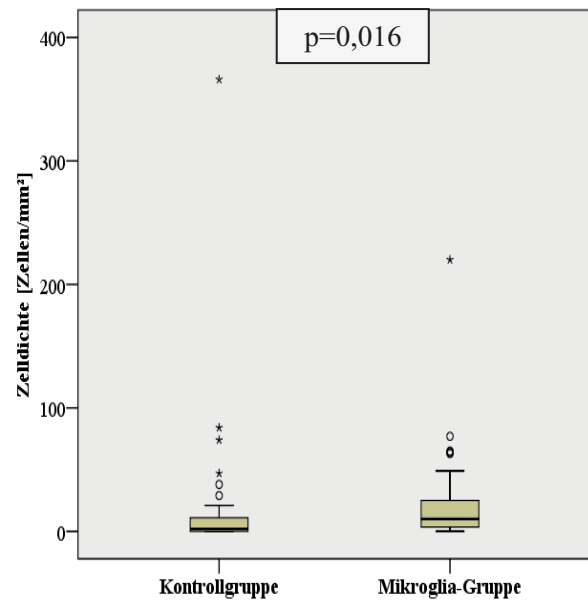


Abbildung 38: Vergleich der Zelldichten amoeboider Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

Zur Beurteilung, ob es im Rahmen einer Sepsis neben den immunphänotypischen zusätzlich zu morphologischen Veränderungen der Mikroglia kommt, wurde das Verhältnis von amoeboiden zu ramifizierten Mikroglia in Mikroglia- und Kontrollgruppe berechnet und anschließend die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei betrug das Verhältnis der beiden Zelltypen in der Mikroglia-Gruppe durchschnittlich 0,43 (HLA) bzw. 0,14 (CD68) und in der Kontrollgruppe 0,41 (HLA) bzw. 0,14 (CD68). Es ergaben sich weder in der HLA-, noch in der CD68-Färbung statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Quotienten zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 39 und Abbildung 40).

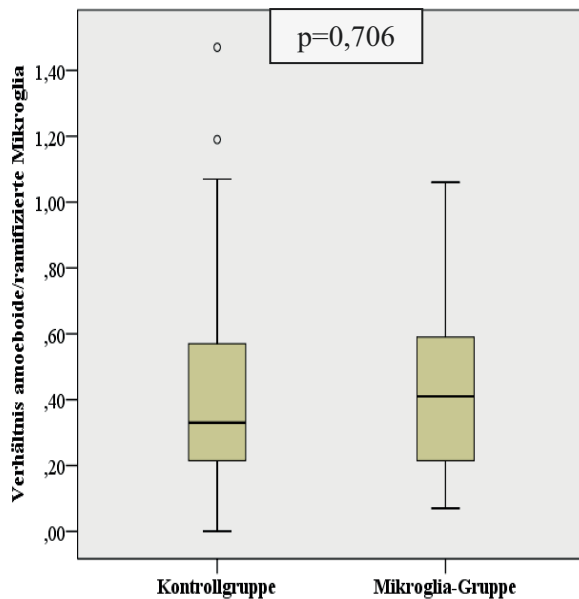


Abbildung 39: Vergleich des Quotienten aus amoeboiden und ramifizierten Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA (° - Ausreißer)

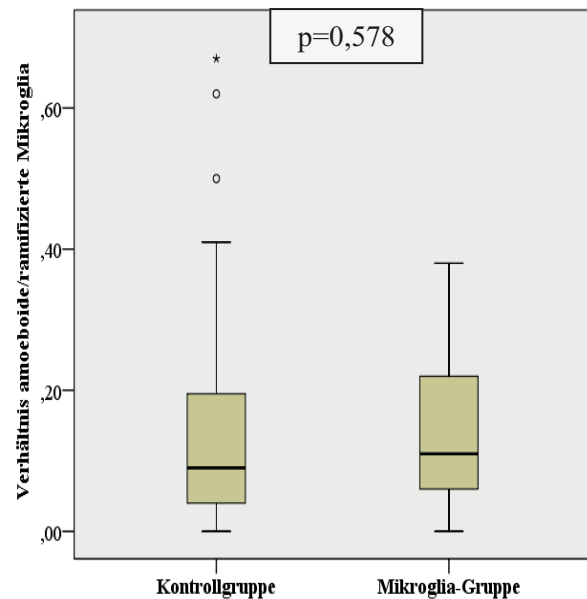


Abbildung 40: Vergleich des Quotienten aus amoeboiden und ramifizierten Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (* - Extremwerte, ° - Ausreißer)

5.4.4 Mikroglia-dichte in unterschiedlichen Regionen der Medulla oblongata

Neben der Berechnung einer durchschnittlichen mikroglialen Zelldichte für den gesamten Bereich der Medulla oblongata, erfolgte zusätzlich eine differenzierte Betrachtung von fünf funktionell-anatomisch unterschiedlichen Regionen innerhalb der Medulla oblongata. Darunter die Pyramidenbahn, die Olive, die olivocerebellaren Fasern, der Tractus solitarius sowie die Kerngebiete der Rautengrube. Zur Bestimmung der Mikroglia-dichte wurden von jeder Region jeweils 2 Bilder (linke und rechte Seite) morphometrisch ausgewertet und anschließend ein Durchschnittswert gebildet. Die Abbildung 41 und Abbildung 42 zeigen beispielhaft die Region des Tractus solitarius in der HLA- und CD68-Färbung.

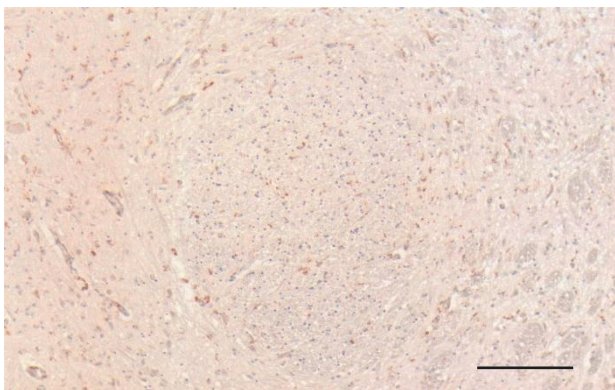


Abbildung 41: Tractus solitarius, CD68 (Messbalken 200 µm)

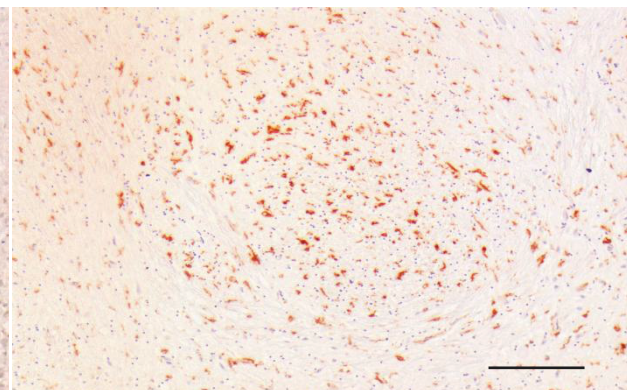


Abbildung 42: Tractus solitarius, HLA (Messbalken 200 µm)

Die Abbildung 43 und Abbildung 44 geben einen Überblick über die Mikroglia-dichte der verschiedenen Regionen in Mikroglia- und Kontrollgruppe in HLA- und CD68-Färbung. Sowohl in der Mikroglia- als auch in der Kontrollgruppe zeigte sich dabei die höchste Dichte immunpositiver Zellen in der Region des Tractus solitarius. Diese lag in der Mikroglia-Gruppe durchschnittlich bei 503 (HLA) bzw. 177 (CD68) Zellen/mm² und in der Kontrollgruppe bei 538 (HLA) bzw. 115 (CD68) Zellen/mm². Im Gegensatz dazu wurde die niedrigste Zelldichte in der Mikroglia-Gruppe im Bereich der Pyramidenbahn mit 297 Zellen/mm² (HLA) bzw. der Rautengrube mit 129 Zellen/mm² (CD68) und in der Kontrollgruppe im Bereich der olivocerebellaren Fasern mit 356 Zellen/mm² (HLA) bzw. der Rautengrube mit 63 Zellen/mm² (CD68) gemessen.

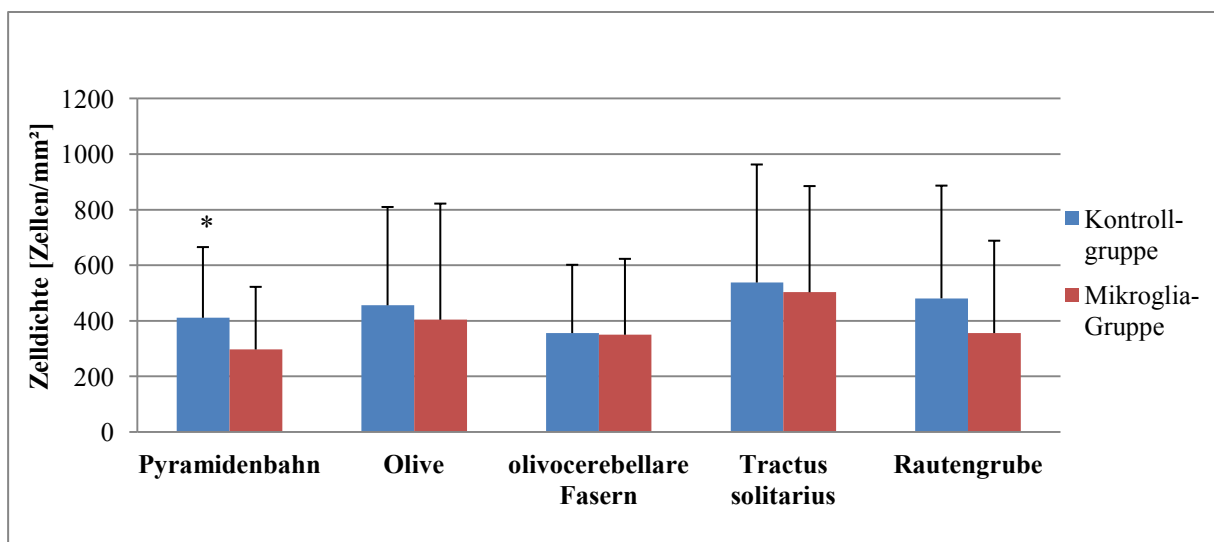


Abbildung 43: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den einzelnen Regionen der Medulla oblongata, HLA (Fehlerbalken entspricht SD, * entspricht $p < 0,05$)

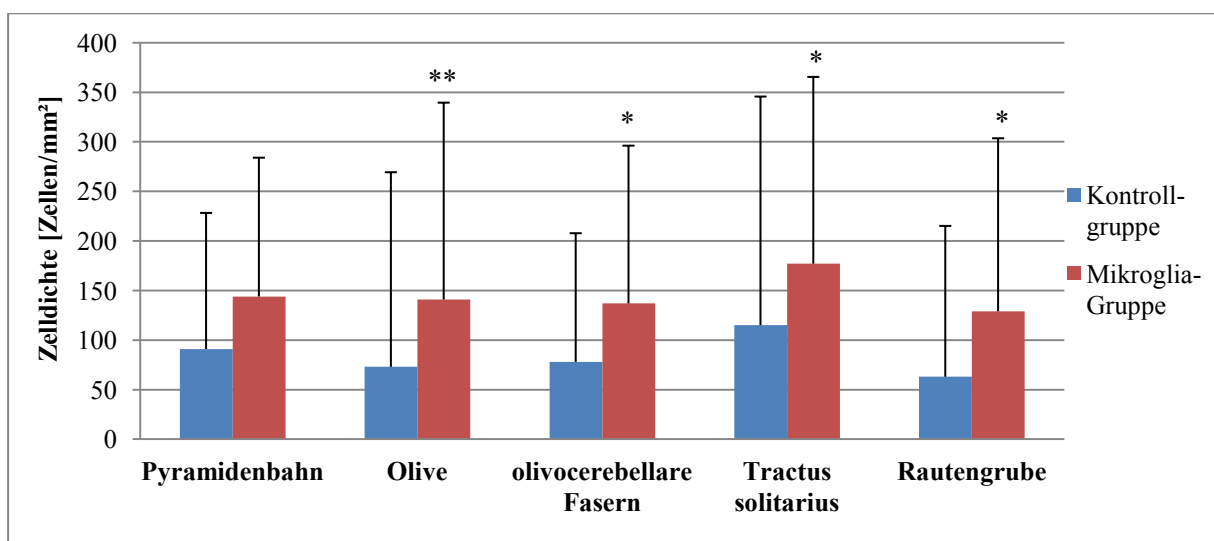


Abbildung 44: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den einzelnen Regionen der Medulla oblongata, CD68 (Fehlerbalken entspricht SD, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$)

Hierbei zeigte sich in der CD68-Färbung ein statistisch signifikanter Unterschied in der Mikroglia-dichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in den Regionen der Olive ($p=0,006$), der olivocerebellaren Fasern ($p=0,022$), des Tractus solitarius ($p=0,033$) und der Rautengrube ($p=0,032$). Lediglich im Bereich der Pyramidenbahn wurde das Signifikanzniveau verfehlt ($p=0,066$). Im Gegensatz dazu konnte in der HLA-Färbung ein signifikanter Unterschied in der Mikroglia-dichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in der Region der Pyramidenbahn gemessen werden ($p=0,043$), während in den übrigen Regionen der Medulla oblongata keine Signifikanz erreicht wurde. Die Abbildung 45 bis Abbildung 48 zeigen die Ergebnisse beispielhaft für die Region des Tractus solitarius.

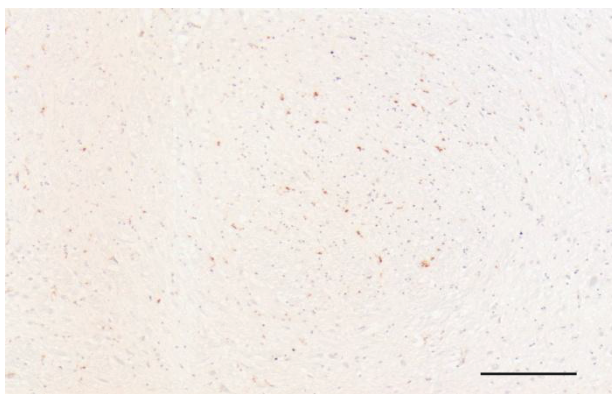


Abbildung 45: Tractus solitarius, Kontrollgruppe, CD68 (Messbalken 200 μm)

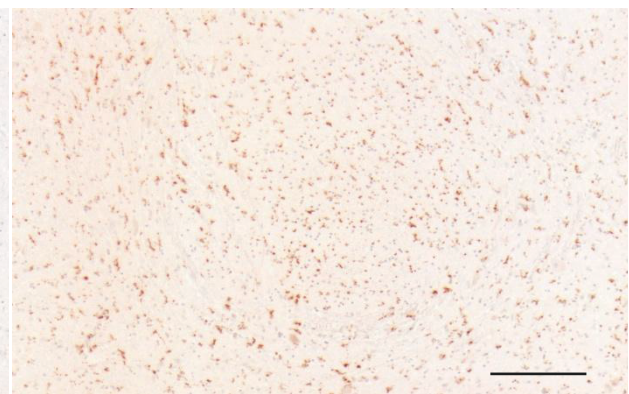


Abbildung 46: Tractus solitarius, Mikroglia-Gruppe, CD68 (Messbalken 200 μm)

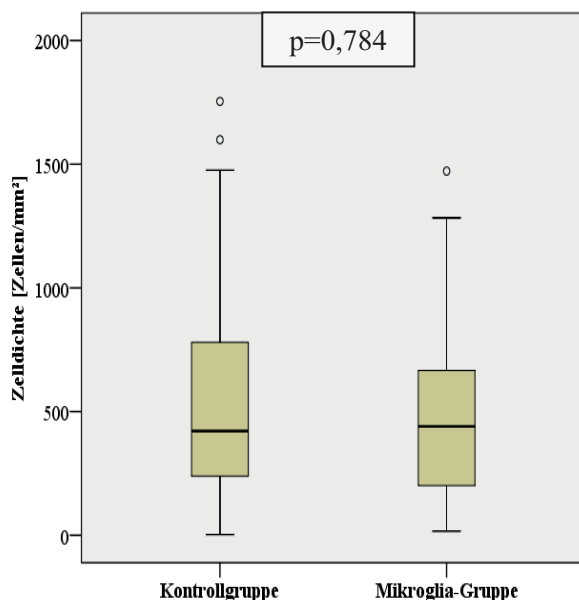


Abbildung 47: Vergleich der Mikroglia-dichte im Tractus solitarius zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA (°- Ausreißer)

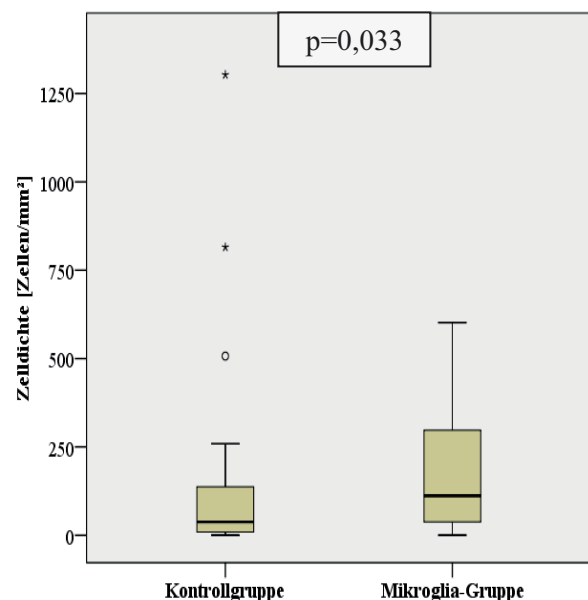


Abbildung 48: Vergleich der Mikroglia-dichte im Tractus solitarius zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

Neben der Gesamtzelldichte wurde zusätzlich die Zelldichte der ramifizierten und amoeboiden Mikroglia für jede der fünf Regionen erfasst. Dabei konnten sowohl für die ramifizierten als auch für die amoeboid konfigurierten Mikroglia die höchsten Werte im Bereich des Tractus solitarius gemessen werden. Die Regionen mit den niedrigsten Zelldichten für ramifizierte und amoeboiden Mikroglia variierten je nach angewandter immunhistochemischer Färbung und Gruppenzugehörigkeit.

Analog zu den Ergebnissen der Gesamtzelldichte erreichten die Unterschiede in der Zelldichte ramifizierter Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in der CD68-Färbung in jeder der fünf Regionen statistische Signifikanz, während in der HLA-Färbung in keiner Region signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vorlagen. Darüber hinaus konnten für die Zelldichte der amoeboid konfigurierten Mikroglia in der CD68-Färbung statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in allen Regionen, mit Ausnahme der Pyramidenbahn, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu erreichten in der HLA-Färbung die Unterschiede der Zelldichte amoeboider Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in keiner Region statistische Signifikanz. Die Abbildung 49 bis Abbildung 52 zeigen die Ergebnisse beispielhaft für die Region der Olive.

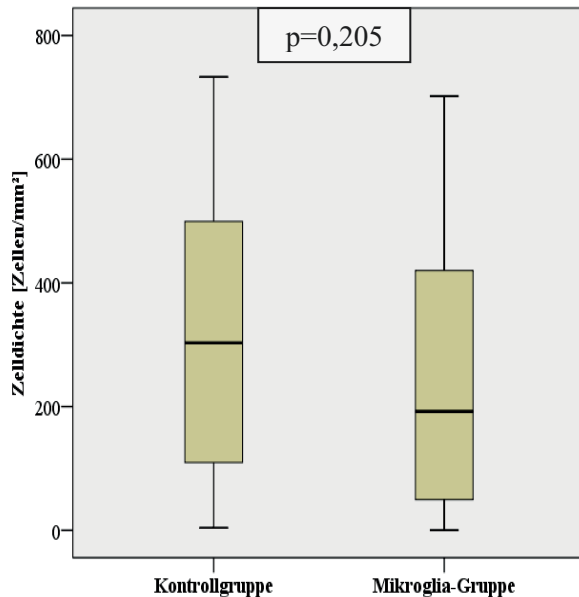


Abbildung 49: Vergleich der Zelldichte ramifizierter Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA

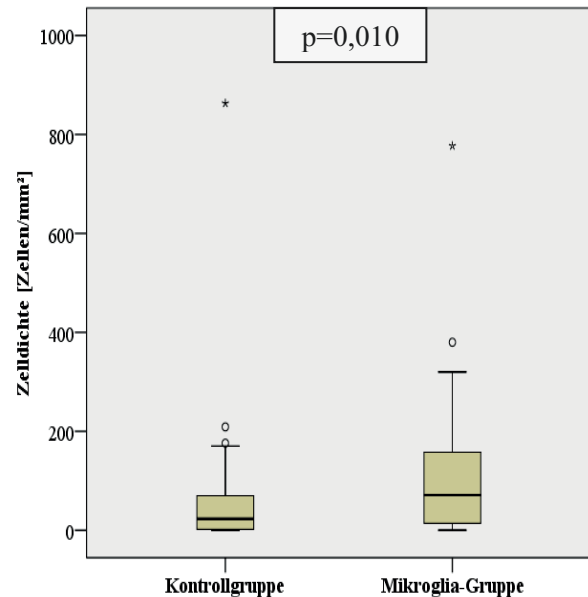


Abbildung 50: Vergleich der Zelldichte ramifizierter Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

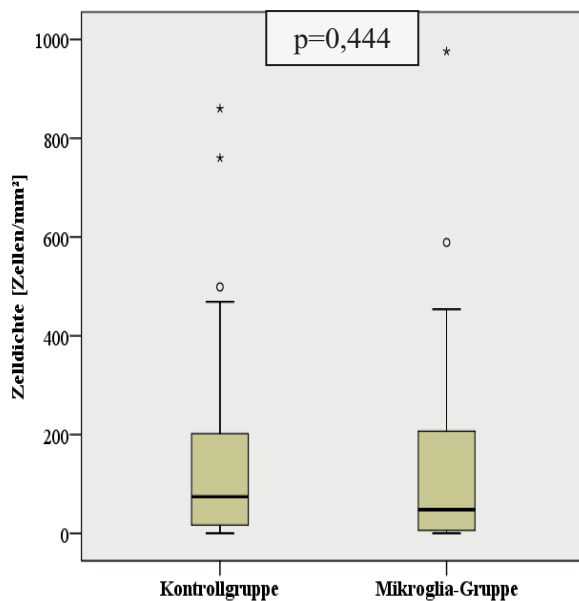


Abbildung 51: Vergleich der Zelldichte amoeboider Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

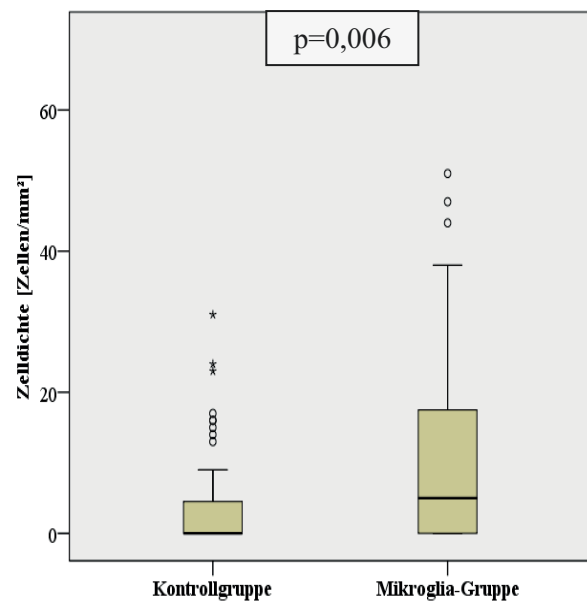


Abbildung 52: Vergleich der Zelldichte amoeboider Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68 (*- Extremwerte, °- Ausreißer)

5.4.5 Korrelation der Mikroglia-dichte zwischen den Regionen

Während der mikroskopischen Betrachtung der histologischen Schnitte entstand der Eindruck, dass die immunpositiven Zellen zuweilen sehr heterogen über die Medulla oblongata verteilt waren und zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den definierten Regionen bestanden.

Um diesen subjektiven Eindruck zu objektivieren, wurden die ermittelten Werte der Mikroglia-dichte der einzelnen Regionen sowohl untereinander als auch mit der durchschnittlichen Mikroglia-dichte des gesamten Schnittes korreliert. Dabei zeigte sich, dass die Korrelation zwischen den mikroglialen Zelldichten der verschiedenen Regionen auf einem Niveau von 0,01 (zweiseitig) signifikant waren. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient lag dabei zwischen 0,616 und 0,817 in der HLA- bzw. 0,771 und 0,912 in der CD68-Färbung (vgl.

Abbildung 53). Außerdem korrelierte Mikroglia-dichte jeder einzelnen Region mit der durchschnittlichen mikroglialen Zelldichte des gesamten Schnittes signifikant auf dem gleichen Niveau. Ebenfalls signifikant auf einem Niveau von 0,01 war die Korrelation der Dichtewerte der ramifizierten und amoeboiden Mikroglia, unabhängig von der Region. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag dabei zwischen 0,597 und 0,764 in der HLA- bzw. 0,804 und 0,904 in der CD68-Färbung (vgl. Abbildung 54).

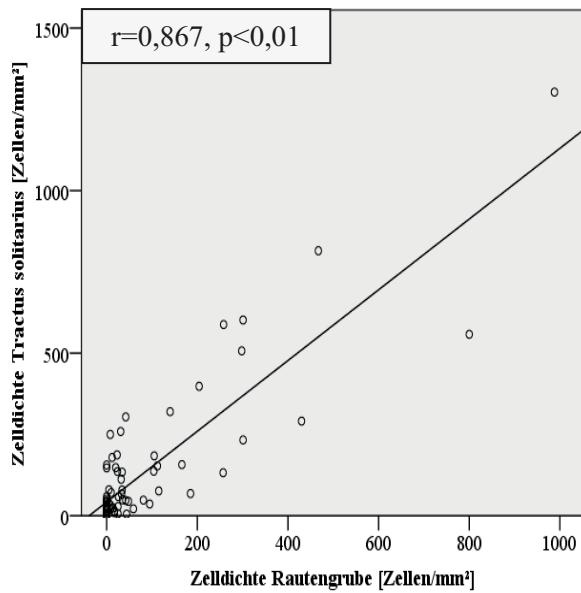


Abbildung 53: Korrelation der Mikroglia-dichte zwischen dem Tractus solitarius und der Rautengrube, CD68

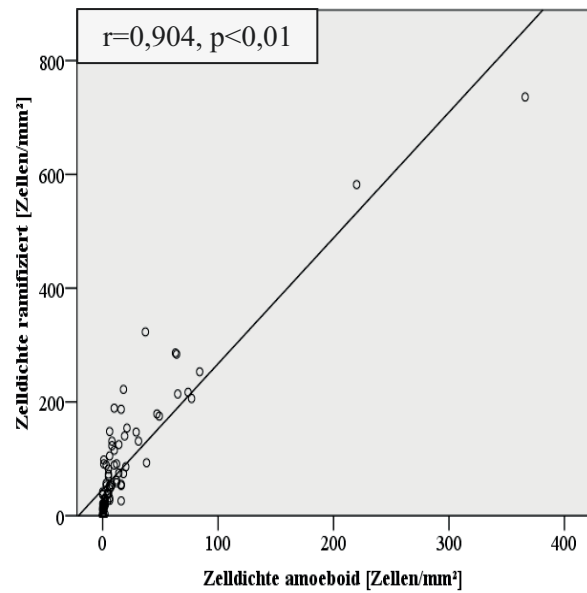


Abbildung 54: Korrelation der Mikroglia-dichte zwischen ramifizierten und amoeboiden Mikroglia, CD68

5.4.6 Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Mikroglia-dichte

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde weiterhin untersucht, ob Unterschiede in der Mikroglia-dichte zwischen den Geschlechtern bestehen und ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der Dichte immunpositiver Zellen festgestellt werden kann und somit eine Beeinflussung der erhobenen Daten durch Alter oder Geschlecht in Betracht gezogen werden muss.

5.4.6.1 Einfluss des Alters auf die Mikroglia-dichte

Die Abbildung 55 und Abbildung 56 geben einen Überblick über die Altersverteilung des im Rahmen der Arbeit untersuchten Patientenkollektivs (n=86). Der Altersdurchschnitt betrug insgesamt 67,2 Jahre. Mehr als die Hälfte der Patienten (54%) waren zum Zeitpunkt ihres Todes 70 Jahre oder älter, nur 4 Patienten (5%) waren jünger als 40 Jahre. Zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des durchschnittlichen Alters (vgl. Tabelle 9).

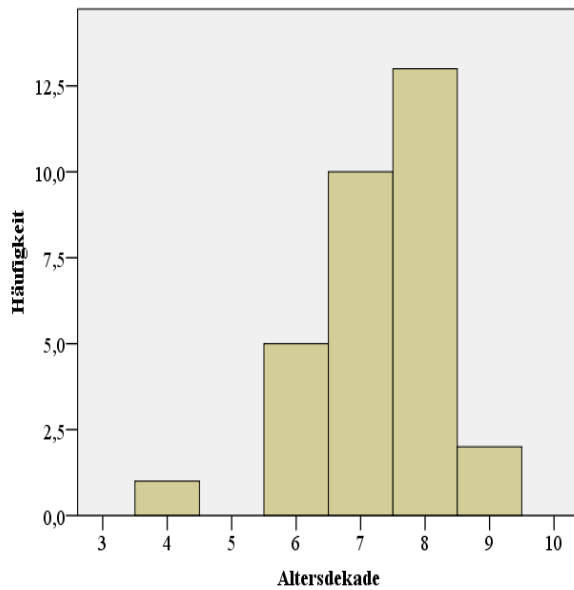


Abbildung 55: Altersverteilung, Mikroglia-Gruppe (n=31)

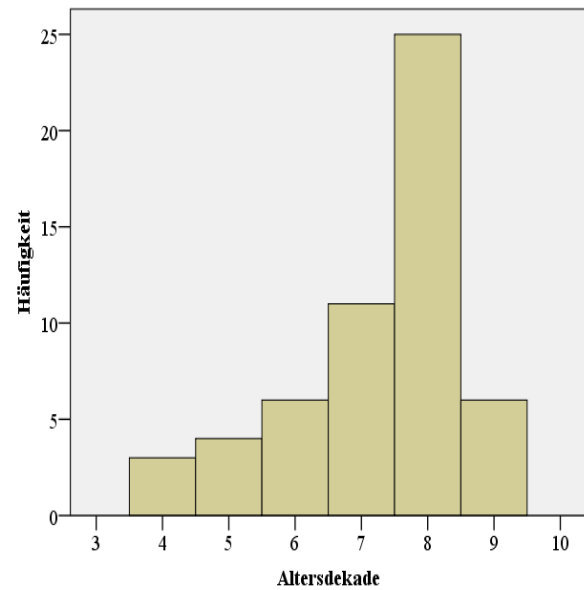


Abbildung 56: Altersverteilung, Kontrollgruppe (n=55)

Mittels Pearson-Korrelation wurde der Zusammenhang zwischen Alter und der Mikrogliadichte jeder Region und beider Zelltypen untersucht. Im Ergebnis dieser statistischen Analyse konnte in der CD68-Färbung weder in der Mikroglia- noch in der Kontrollgruppe eine signifikante Korrelation zwischen dem Alter und der Mikrogliadichte, unabhängig von Region und Zelltyp, festgestellt werden (vgl. Abbildung 57). In der HLA-Färbung hingegen ergab sich bei den Patienten der Mikroglia-Gruppe eine statistisch signifikante Korrelationen zwischen dem Alter und der Mikrogliadichte im Bereich des Tractus solitarius (vgl. Abbildung 58). Dabei waren die Korrelationen sowohl zwischen Alter und ramifizierter bzw. amoeboider Mikrogliadichte als auch die Korrelation zwischen Alter und allgemeiner Mikrogliadichte bei einem Niveau von 0,05 statistisch signifikant.

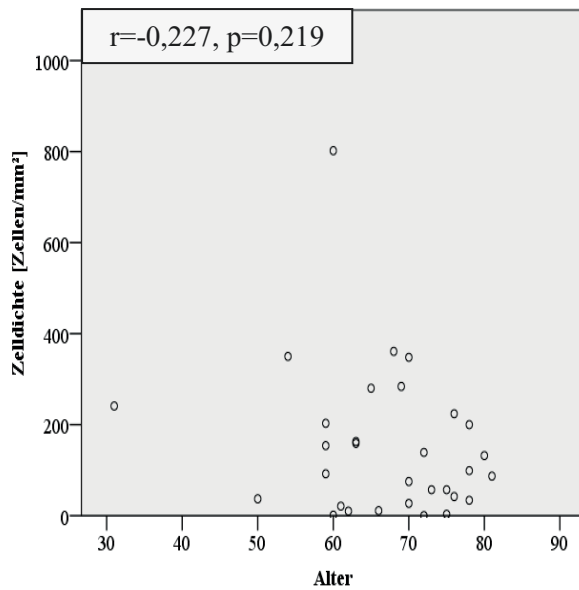


Abbildung 57: Korrelation zwischen Mikroglia-dichte und Alter in der Mikroglia-Gruppe, CD68

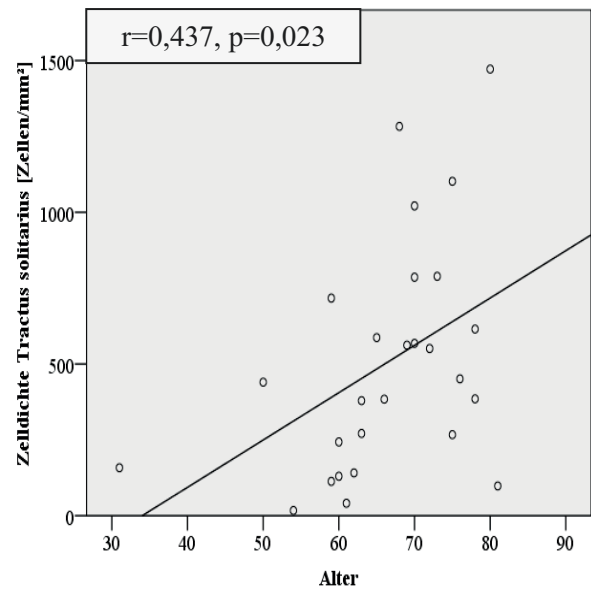


Abbildung 58: Korrelation zwischen Mikroglia-dichte des Tractus solitarius und Alter in der Mikroglia-Gruppe, HLA

5.4.6.2 Einfluss des Geschlechts auf die Mikroglia-dichte

Das untersuchte Patientenkollektiv ($n=86$) bestand insgesamt aus 56 männlichen und 30 weiblichen Personen. Abbildung 59 veranschaulicht die Geschlechterverteilung in Mikroglia- und Kontrollgruppe.

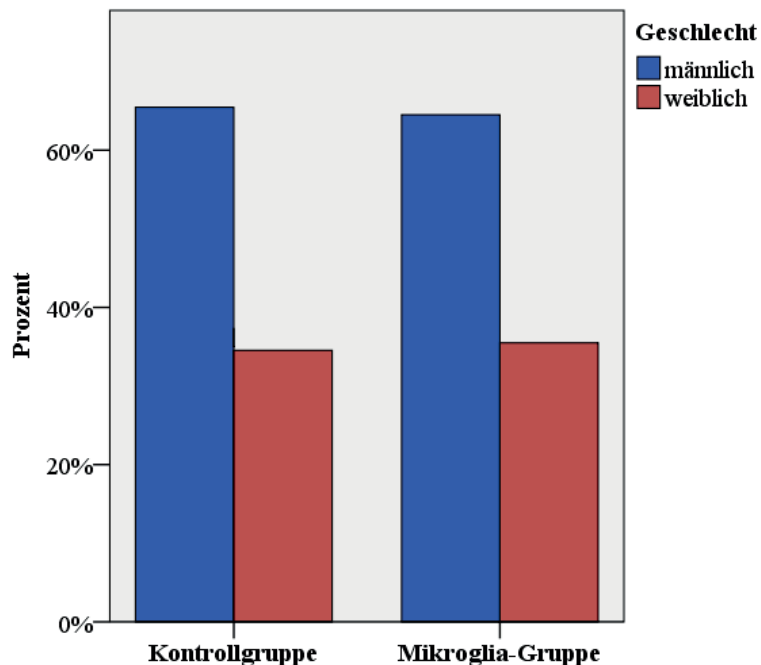


Abbildung 59: Geschlechterverteilung der Mikroglia- und Kontrollgruppe

Die statistischen Auswertungen zum Vergleich der Mikrogliadichte zwischen den Geschlechtern ergaben in der HLA-Färbung eine mittlere Zelldichte von 419 Zellen/mm² bei den Männern bzw. 424 Zellen/mm² bei den Frauen und in der CD68-Färbung 113 Zellen/mm² bei den Männern bzw. 98 Zellen/mm² bei den Frauen. Es konnten dabei unabhängig von der immunhistochemischen Färbung und der untersuchten Region keine signifikanten Unterschiede in der Mikrogliadichte zwischen Männern und Frauen gefunden werden (vgl. Abbildung 60 und Abbildung 61).

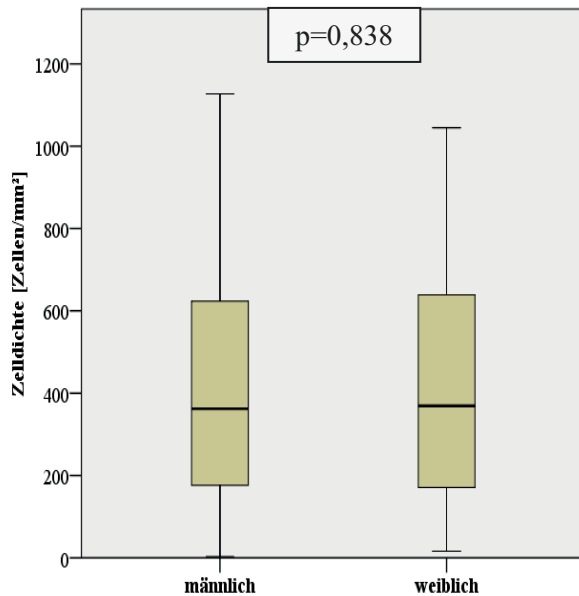


Abbildung 60: Vergleich der Mikrogliadichte zwischen Männern und Frauen, HLA

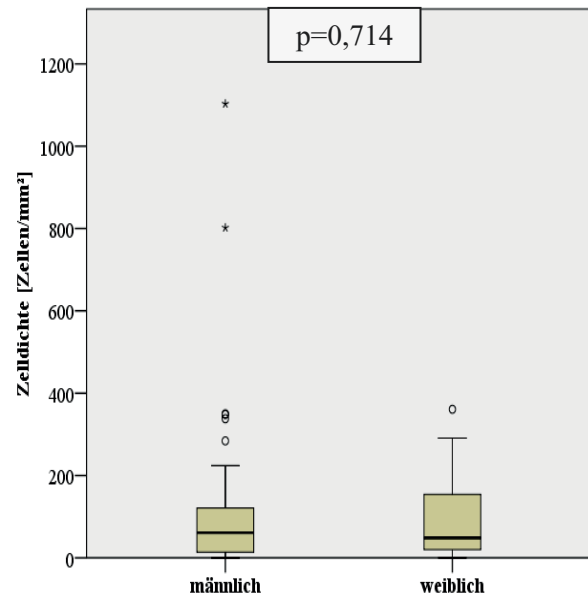


Abbildung 61: Vergleich der Mikrogliadichte zwischen Männern und Frauen, CD68 (*- Extremwerte, ° - Ausreißer)

5.4.7 Einfluss von Begleiterkrankungen auf die Mikrogliadichte

Weiterhin sollte der mögliche Einfluss von zentralnervösen Begleiterkrankungen auf die Mikrogliadichte untersucht werden. Abbildung 62 gibt einen Überblick über die im gesamten Patientenkollektiv (n=86) vorliegenden Begleiterkrankungen, wobei bei 5 (6%) Patienten mehr als eine der beschriebenen Erkrankungen vorlag. Aus der Darstellung geht hervor, dass es sich bei den zentralnervösen Begleiterkrankungen am häufigsten um die Alzheimer-Krankheit (20 von 86 Patienten) handelte, gefolgt von zerebralen Ischämien (17 von 86 Patienten). Aufgrund dessen wurde sich in den nachfolgenden Abschnitten auf die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse durch diese beiden Krankheitsbilder beschränkt.

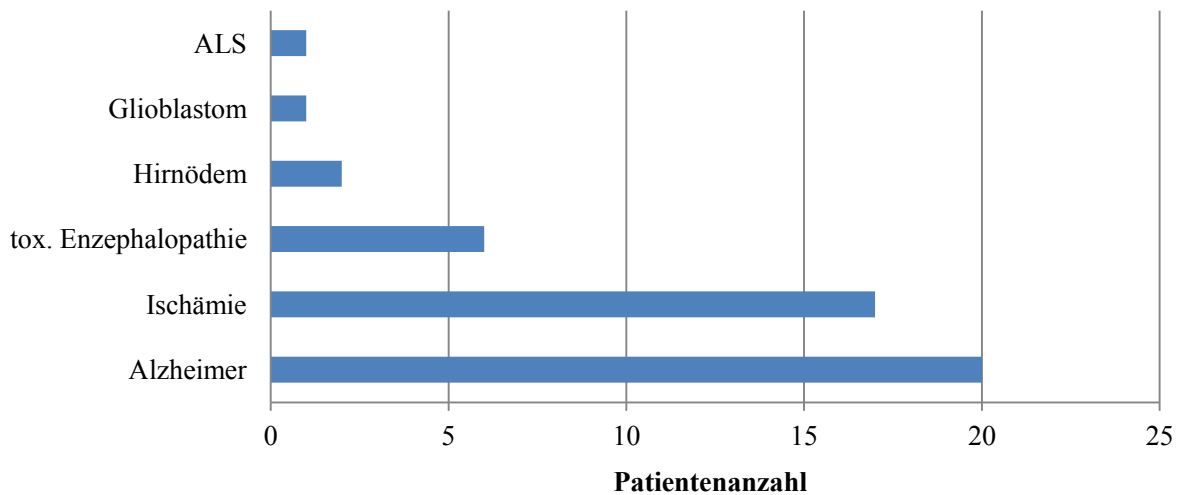


Abbildung 62: Übersicht über die zerebralen Begleiterkrankungen des Patientenkollektivs

5.4.7.1 Einfluss von Alzheimer auf die Mikroglia-dichte

Um den Einfluss einer bestehenden Alzheimer-Erkrankung auf die Messwerte zu untersuchen, wurde das gesamte Patientenkollektiv anhand der neuropathologischen Befunde in 4 Gruppen hinsichtlich der Diagnosen Sepsis und Alzheimer unterteilt. Eine Übersicht über diese Gruppen zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21: Gruppeneinteilung nach Alzheimer und Sepsis

Gruppen-Nr.	Bezeichnung	Anzahl der Patienten
1	weder Alzheimer noch Sepsis	47
2	Alzheimer, aber keine Sepsis	8
3	Sepsis, aber kein Alzheimer	19
4	sowohl Alzheimer als auch Sepsis	12

Ein Vergleich der durchschnittlichen Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen zeigte, dass die höchste Dichte an HLA-positiven Zellen in Gruppe 1 und die geringste Dichte in Gruppe 3 zu verzeichnen waren. In der CD68-Färbung hatte dagegen die Gruppe 3 die höchste und die Gruppen 1 und 2 die niedrigsten Zelldichten. Die Untersuchungen der Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen ergaben weder in der HLA-Färbung ($p=0,535$) noch in der CD68-Färbung ($p=0,074$) einen statistisch signifikanten Unterschied (vgl. Abbildung 63 und Abbildung 64).

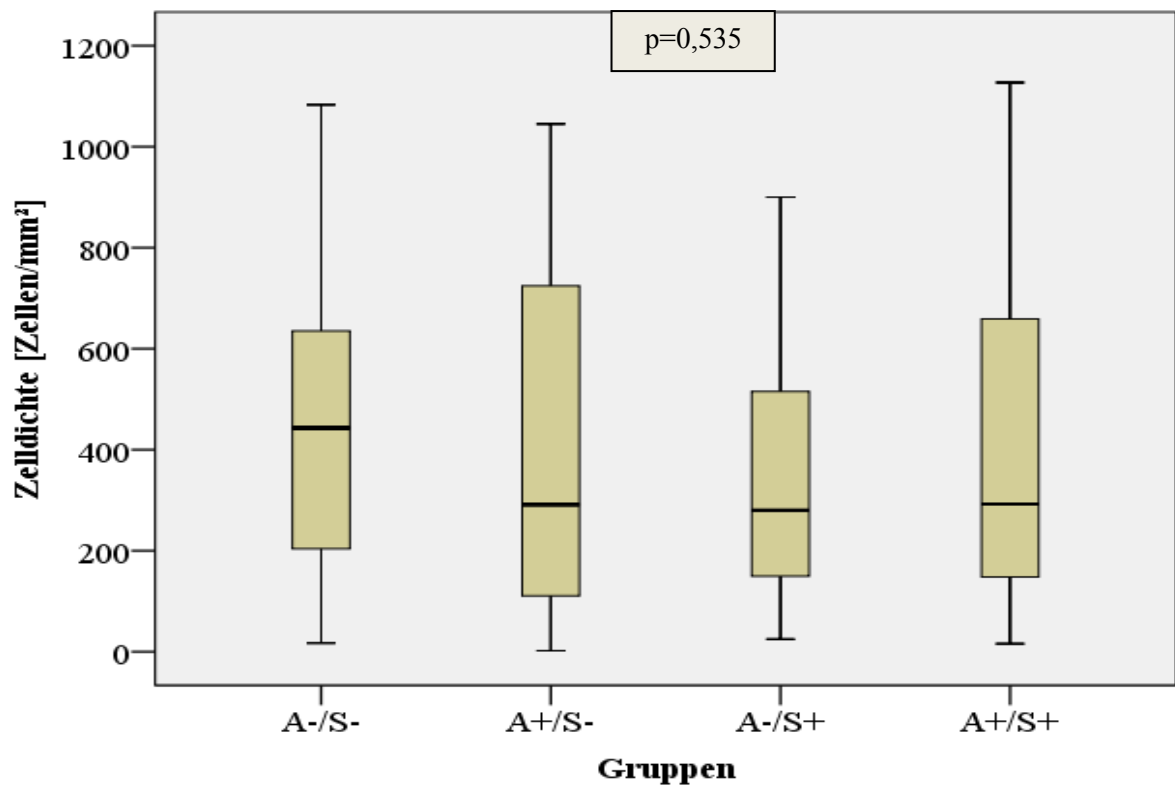


Abbildung 63: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen, HLA („A“- Alzheimer, „S“- Sepsis, „-“ negativ, „+“ positiv)

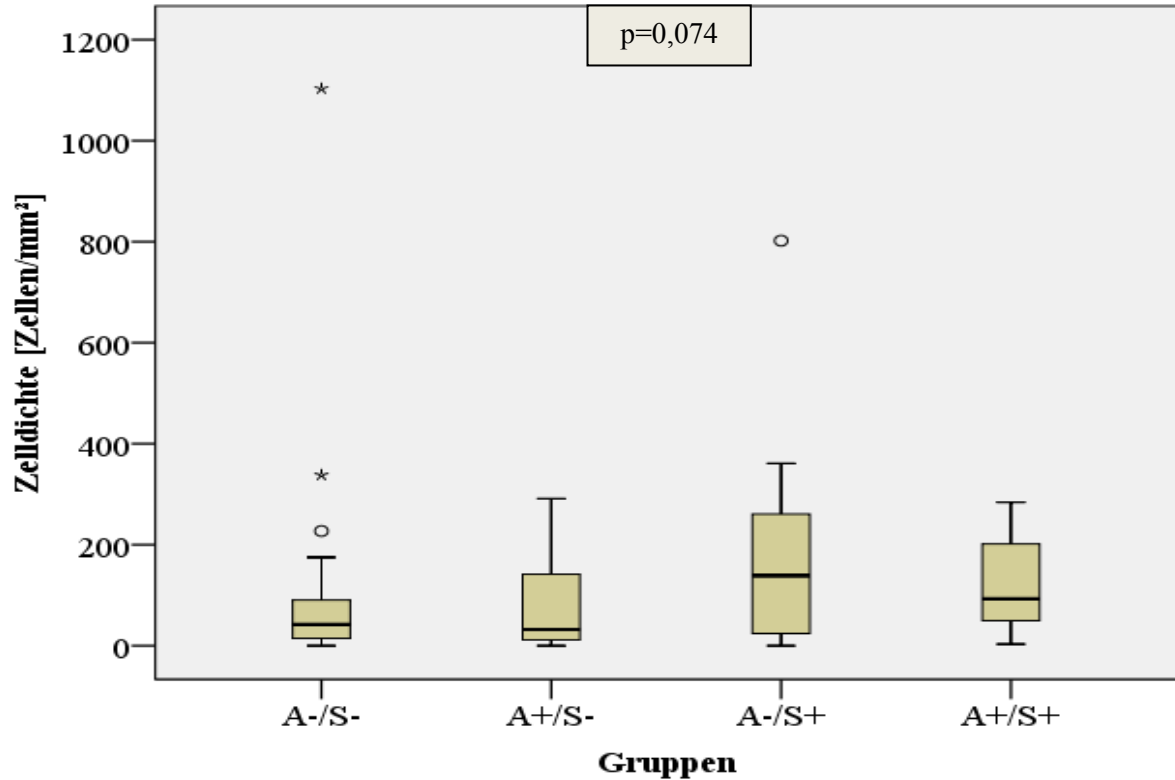


Abbildung 64: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen, CD68 („A“- Alzheimer, „S“- Sepsis, „-“ negativ, „+“ positiv, * - Extremwerte, o - Ausreißer)

5.4.7.2 Einfluss der zerebralen Ischämie auf die Mikroglia-dichte

Um den Einfluss einer zerebralen Ischämie auf die Mikroglia-dichte zu untersuchen, wurde analog zur Untersuchung des Einflusses der Alzheimer-Erkrankung verfahren. Es erfolgte eine Einteilung der Patienten in 4 Gruppen, welche durch die neuropathologische Einschätzung hinsichtlich des Vorliegens einer Sepsis und/oder Ischämie definiert wurden (vgl. Tabelle 22).

Tabelle 22: Gruppeneinteilung nach Ischämie und Sepsis

Gruppen-Nr.	Bezeichnung	Anzahl der Patienten
1	weder Ischämie noch Sepsis	48
2	Ischämie, aber keine Sepsis	7
3	Sepsis, aber keine Ischämie	21
4	sowohl Ischämie als auch Sepsis	10

Da zerebrale Durchblutungsstörungen erwartungsgemäß vor allem zu Veränderungen in der Pyramidenbahn führen, wurde im Gegensatz zur Untersuchung des Einflusses der Alzheimer-Erkrankung die Mikroglia-dichte ausschließlich im Bereich der Pyramidenbahn zwischen den Gruppen verglichen. Dabei wies die Gruppe 1 die höchste Dichte und die Gruppe 4 die niedrigste Dichte an HLA-markierten Zellen auf. In der CD68-Färbung konnte hingegen die größte Zelldichte in Gruppe 4 und geringste Zelldichte in Gruppe 2 verzeichnet werden. Die Unterschiede der Mikroglia-dichte zwischen den einzelnen Gruppen verfehlten jedoch sowohl in der HLA- ($p=0,110$) als auch in der CD68-Färbung ($p=0,146$) statistische Signifikanz (vgl. Abbildung 65 und Abbildung 66).

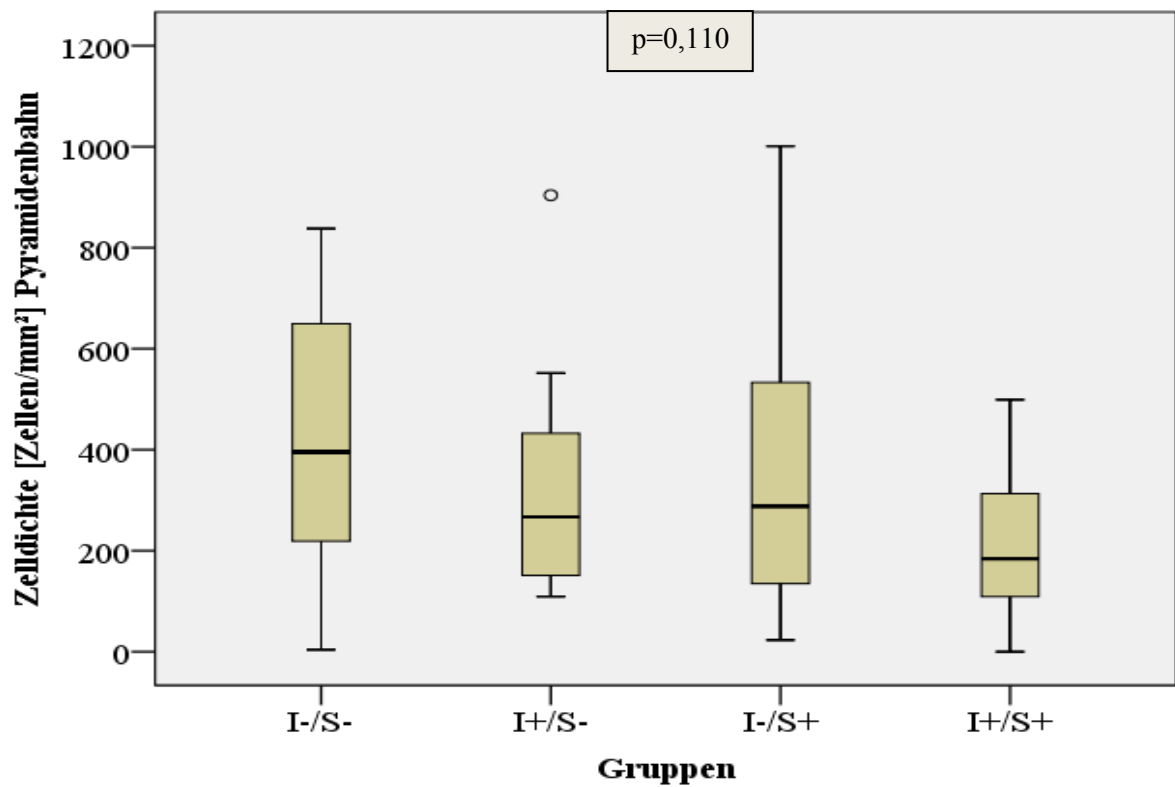


Abbildung 65: Vergleich der Mikrogliadichte zwischen den Gruppen, HLA („I“- Ischämie, „S“- Sepsis, „-“ negativ, „+“ positiv, °- Ausreißer)

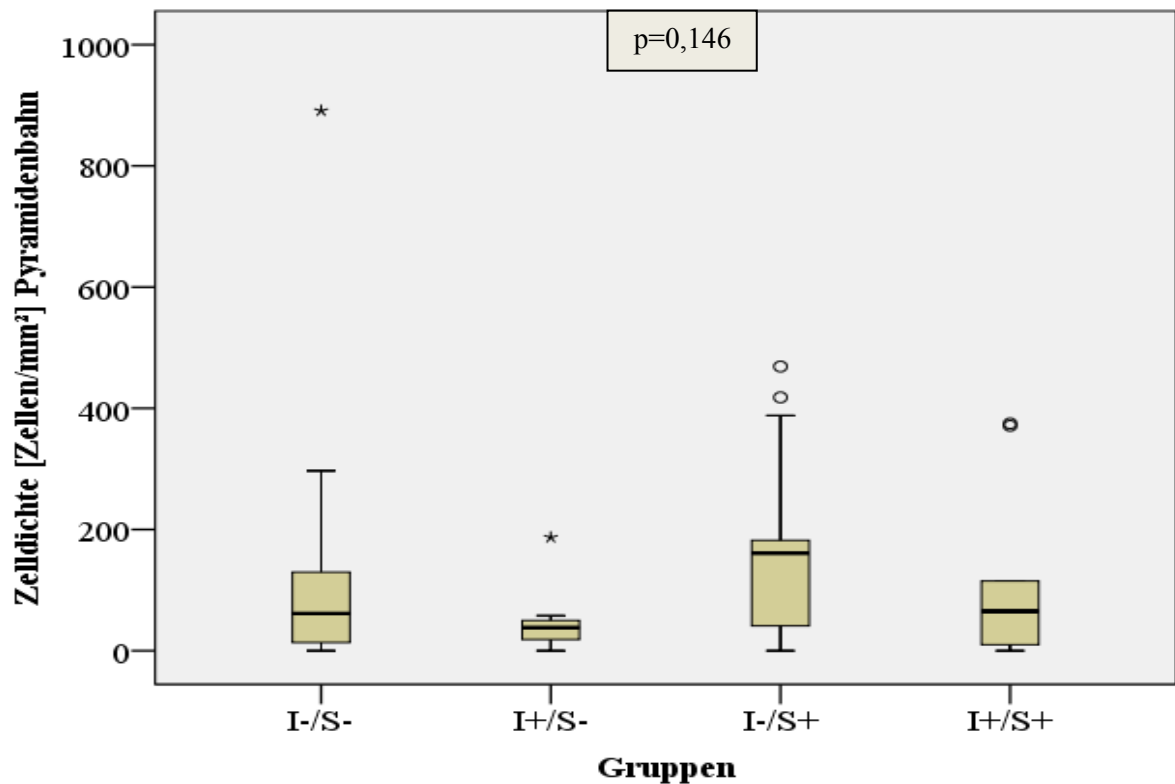


Abbildung 66: Vergleich der Mikrogliadichte zwischen den Gruppen, CD68 („I“- Ischämie, „S“- Sepsis, „-“ negativ, „+“ positiv, * - Extremwerte, °- Ausreißer)

6 Diskussion

6.1 Mikrogliaknötchen in der Routine-HE-Färbung

Es existieren bisher nur sehr wenige Beschreibungen von Mikrogliaknötchen im Zusammenhang mit einer Sepsis. So beschrieb Prange erstmals „knötchenartige Gliareaktionen“ im Rahmen der septischen Herdenzephalitis (Prange 2006) und in einer Studie von Lemstra et al. konnten ebenfalls kleine Zusammenlagerungen aktivierter Mikroglia-Zellen im Kortex von Sepsispatienten festgestellt werden (Lemstra et al. 2007), die jedoch nicht explizit als „Knötchen“ bezeichnet wurden. Darüber hinaus hatten vorausgegangene Untersuchungen an der FSU Jena bereits gezeigt, dass bei ca. 5,5% aller Hirnsektionen Mikrogliaknötchen nachgewiesen werden konnten (Romeike et al. 2011). Dieses Ergebnis konnte nun im Rahmen einer ausführlicheren Untersuchung anhand von über 700 Hirnsektionsbefunden in einem Zeitraum von 6 Jahren mit einer Häufigkeit von rund 6% bestätigt werden.

6.1.1 Medulla oblongata als Prädilektionsort für Mikrogliaknötchen

Wie bereits in den Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Romeike et al. angedeutet, konnten auch in der vorliegenden Studie bei ca. 78% der Patienten die Mikrogliaknötchen im Bereich der Medulla oblongata lokalisiert werden (Romeike et al. 2011). Somit kann die Hirnregion der Medulla oblongata eindeutig als Prädilektionsort für das Auftreten Mikrogliaknötchen angesehen werden und eine gezielte Suche nach Mikrogliaknötchen sollte demnach in diesem Bereich beginnen. Die Medulla oblongata ist in vergleichbaren Studien bisher nicht als Prädilektionsort beschrieben worden, wobei sich Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen teilweise von vornherein auf supratentorielle Regionen beschränkten (Lemstra et al. 2007, Singh et al. 2013). Eine zusätzliche Analyse der genauen Lokalisation der Mikrogliaknötchen innerhalb der Medulla oblongata ergab interessanterweise, dass die Mehrzahl der Mikrogliaknötchen im Bereich der olivocerebellaren Fasern auftraten, während die wenigsten Mikrogliaknötchen in der Pyramidenbahn zu verzeichnen waren.

6.1.2 Das Auftreten von Mikrogliaknötchen bei klinischem und autopsischem Verdacht auf Sepsis

Beim Vergleich mit den klinischen Angaben zeigte sich, dass bei 81% der Patienten mit Mikrogliaknötchen in der Medulla oblongata (Mikroglia-Gruppe) tatsächlich auch klinisch der Verdacht auf eine Sepsis bestand. Andererseits lagen bei 78% der Patienten ohne nachweisbare Mikrogliaknötchen (Kontrollgruppe) auch keine klinischen Anhaltspunkte für

eine Sepsis vor. Diese Ergebnisse lassen somit eine klare Korrelation zwischen dem Auftreten von Mikrogliaknötchen in der Medulla oblongata und der klinischen Diagnose einer Sepsis erkennen, wobei basierend auf dem klinischen Sepsis-Verdacht die Sensitivität des Nachweises von Mikrogliaknötchen lediglich 68% und die Spezifität 88% erreicht. Die Ursachen dafür können zum einen in dem frühzeitigen Auftreten der Mikrogliaknötchen, noch bevor die Sepsis klinisch in Erscheinung tritt, begründet sein. Zum anderen kann bei einer klinisch diagnostizierten Sepsis ein negativer Befund hinsichtlich des Auftretens von Mikrogliaknötchen durch die Anschnittebene der Gewebepräparate bedingt sein, sodass tatsächlich vorhandene Mikrogliaknötchen in den Parallelschnitten nicht mehr dargestellt und somit übersehen werden. Diese Rate an falsch negativen Befunden könnte eventuell durch Serienschnitte minimiert werden. Schließlich muss auch die Zuverlässigkeit der klinischen Diagnose kritisch hinterfragt werden. Obwohl eindeutige klinische Kriterien und Klassifikationen für eine Sepsis existieren, werden diese nicht immer konsequent angewendet (Bone et al. 1992). Ähnlich Ergebnisse erbrachte der Vergleich mit den Sektionsbefunden. Bei 74% der Patienten der Mikroglia-Gruppe wurde auch im Rahmen der allgemeinpathologischen Autopsie eine Sepsis diagnostiziert und bei 80% der Patienten der Kontrollgruppe ergab gleichermaßen die Sektion keine morphologischen Hinweise auf das Vorliegen einer Sepsis. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ebenfalls eine hohe Übereinstimmungsrate zwischen dem Auftreten von Mikrogliaknötchen und den autopsischen Befunden hinsichtlich des Vorliegens einer Sepsis feststellen. Allerdings erscheinen auch hierbei die Sensitivität des Nachweises von Mikrogliaknötchen mit 68% und die Spezifität mit 85% lediglich mäßig gut. Wie bereits oben erwähnt, könnten falsch negative Befunde durch die unterschiedlichen Anschnittebenen der Paraffinblöcke bedingt sein. Darüber hinaus könnte das Auftreten von Mikrogliaknötchen ein sehr frühes Zeichen im Rahmen einer Sepsis sein, noch bevor andere Organe im Körper morphologische Korrelate einer Sepsis entwickeln. Es erscheint durchaus logisch, dass sich das Gehirn als immunologisch privilegiertes Organ besonders früh gegen ein septisches Geschehen abschirmen muss. Dieser Vermutung sollte in weiterführenden Studien nachgegangen werden. Darüber hinaus sind auch die pathomorphologischen Kriterien einer Sepsis nur unzureichend definiert und eine eindeutige Klassifikation für die autopsische Diagnose einer Sepsis fehlt bislang. Demnach verwundert es auch nicht, dass sich wiederum ähnliche Ergebnisse beim Vergleich zwischen allgemeinpathologischem Befund und klinischem Verdacht hinsichtlich einer Sepsis fanden. Die Sensitivität der autopsisch gestellten Sepsisdiagnose bezogen auf den klinischen Sepsis-Verdacht lag dabei mit 76% etwas höher, während die Spezifität mit 88% etwa vergleichbar

war. Und auch beim Vergleich aller drei Parameter (neuropathologischer, klinischer und autoptischer Befund) bestätigte sich die Annahme, dass Mikrogliaknötchen gehäuft im Gehirn von Patienten mit Verdacht auf eine Sepsis auftreten. So stimmten bei insgesamt 70% der untersuchten Patienten die Befunde aller drei Fachdisziplinen überein. Mikrogliaknötchen können demnach einen wichtigen Hinweis auf das mögliche Vorliegen einer Sepsis liefern, stellen jedoch keinesfalls einen Beweis für eine solche dar. Außerdem lässt sich anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht zweifelsfrei feststellen, ob Mikrogliaknötchen bereits vor einer klinischen Manifestation in Erscheinung treten oder ob sie eher als eine spätere Reaktion im Verlauf eines prolongierten septischen Geschehens zu sehen sind.

Letztlich bleiben jedoch bei der klinischen Diagnostik, bei der Autopsie und auch bei der neuropathologischen Untersuchung immer Unsicherheiten, ob tatsächlich eine Sepsis vorlag oder nicht. Für eine Sepsis-Klassifikation wären daher Parameter mit höherer Spezifität und vor allem Sensitivität wünschenswert.

6.1.3 Einfluss der Schnittebene

Zur Überprüfung inwieweit unterschiedliche Schnittebenen die Ergebnisse beeinflussen, wurden im Rahmen der Arbeit alle Paraffinblöcke erneut angeschnitten und mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dabei konnten bei knapp einem Drittel der Patienten (32%) mit zuvor beschriebenen Mikrogliaknötchen (Mikroglia-Gruppe) diese in den Parallelschnitten nicht mehr nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite wurden bei 15% der Patienten der Kontrollgruppe, d.h. ohne Mikrogliaknötchen im ursprünglichen Befund, bei erneutem Anschnitt und mikroskopischer Analyse der HE-Präparate erstmals einzelne Mikrogliaknötchen nachgewiesen. Bezogen auf den Nachweis von Mikrogliaknötchen in der initialen Routine-HE-Färbung, erreichte der Nachweis von Mikrogliaknötchen auf den Parallelschnitten eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 85%. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Gruppeneinteilung bzw. Diagnose basierend auf dem Auftreten von Mikrogliaknötchen grundsätzlich mit einer gewissen Fehlerquote behaftet ist. Bei erneutem Anschneiden der Paraffinblöcke können bedingt durch die veränderte Schnittebene sowohl zuvor dargestellte Mikrogliaknötchen verschwinden, als auch neue Mikrogliaknötchen in Erscheinung treten. Dabei ist im Rahmen der Sepsisdiagnose vor allem Letzteres von Bedeutung. Bei erstmaliger mikroskopischer Analyse können unter Umständen Mikrogliaknötchen nicht dargestellt werden, obwohl sie tatsächlich vorhanden sind. Dies führt zu falsch negativen Befunden, wie sie im Rahmen der Untersuchung bei insgesamt 8 von 86 (9%) Patienten auftraten. So müsste in einer weitergehenden Studie überprüft werden,

ob und wie viele Parallelschnitte zum Erreichen einer höheren Sensitivität benötigt werden. Im Gegensatz dazu spielen falsch positive Befunde in diesem Zusammenhang keine entscheidende Rolle. Wird einmal ein Mikrogliaknötchen dokumentiert, bleibt auch bei nachfolgenden negativen Befunden die Diagnose der Sepsis bestehen.

6.2 Immunhistochemie

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbemethoden sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Detektion der Mikroglia sowohl qualitativ als auch quantitativ verbessert werden. Als wesentlicher Vorteil der Immunhistochemie gilt im Allgemeinen die gezielte Darstellung bestimmter Zellen über spezifische Proteine oder andere Zellstrukturen mit Hilfe markierter Antikörper (Lang 2013), während die HE-Färbung als weitverbreitete Routinefärbemethode vielmehr der strukturellen und orientierenden Übersicht dient (Avwioro 2011). In vergleichbaren Studien stellten sich bereits HLA und CD68 als Marker für Mikroglia als besonders geeignet heraus (Ulvestad et al. 1994, Lemstra et al. 2007). Der hier zusätzlich eingesetzte Antikörper gegen das CD163-Antigen erwies sich bei kaum nachweisbarer Reaktion für die Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit als ungeeignet.

6.2.1 Immunhistochemische Darstellung von Mikrogliaknötchen

Die erstmalige mikroskopische Analyse der Schnitte ergab eine deutlich verstärkte Reaktion der Mikrogliaknötchen in der HLA- im Vergleich zur CD68-Färbung, weshalb die anschließende Quantifizierung und Analyse des Verteilungsmusters der Mikrogliaknötchen innerhalb der Medulla oblongata ausschließlich anhand der HLA gefärbten Präparate durchgeführt wurden.

Beim Vergleich zwischen dem im Dokumentationssystem des Instituts für Pathologie der FSU Jena beschriebenen Auftreten von Mikrogliaknötchen in der HE-Färbung und der Detektion von Mikrogliaknötchen mittels immunhistochemischer HLA-Färbung, zeigte sich bei 27 von 31 (87%) Patienten der Mikroglia-Gruppe eine Übereinstimmung der Befunde. In lediglich 13% der Fälle mit dokumentierten Mikrogliaknötchen in der HE-Färbung konnten diese in der HLA-Färbung nicht mehr dargestellt werden. Dieses Phänomen ist wie bereits oben beim Vergleich der Parallelschnitte auf die unterschiedlichen Anschnittebenen der Paraffinblöcke zurückzuführen, wodurch zuvor dargestellte Mikrogliaknötchen bei späterer Betrachtung tiefer gelegener Ebenen nicht mehr angeschnitten werden und damit verborgen bleiben. In der Kontrollgruppe hingegen war der Befund in der HLA-Färbung bezüglich des Auftretens von Mikrogliaknötchen nur bei 21 von 55 (38%) Patienten ebenfalls negativ,

während in 62% der Fälle einzelne Mikroglia-Knoten erstmals mit Hilfe der HLA-Färbung identifiziert werden konnten. Basierend auf dem Nachweis von Mikroglia-Knoten in der Routine-HE-Färbung, erreichte der Nachweis von Mikroglia-Knoten in der HLA-Färbung eine Sensitivität von 87%, während die Spezifität lediglich 38% betrug.

Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung der Mikroglia-Knoten anhand der HLA- und im Rahmen der Arbeit eigens angefertigten HE-Präparate. Dabei konnten für die Mikroglia- und die Kontrollgruppe statistisch höchst signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an Mikroglia-Knoten zwischen HE- und HLA-Färbung festgestellt ($p < 0,001$) werden. Darüber hinaus ergab die quantitative Analyse der Mikroglia-Knoten sowohl in der HLA- als auch in der HE-Färbung statistisch höchst signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an Mikroglia-Knoten zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Während in der Mikroglia-Gruppe durchschnittlich 9 Mikroglia-Knoten pro Patient in der HLA- bzw. 2 Mikroglia-Knoten in der HE-Färbung gefunden werden konnten, lag die durchschnittliche Anzahl an Mikroglia-Knoten in der Kontrollgruppe bei 2 (HLA) bzw. 0,36 (HE) pro Patient. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl anhand der HE- als auch der HLA-Färbung eine Beurteilung hinsichtlich einer Sepsis basierend auf dem Nachweis von Mikroglia-Knoten möglich ist. Trotz des hohen Anteils an Patienten ohne ursprüngliche Mikroglia-Knoten in der HE-Färbung, aber mit einzelnen Mikroglia-Knoten in der HLA-Färbung, erscheint eine Gruppeneinteilung basierend auf den HE-Befunden gerechtfertigt. Demzufolge sollte die postmortale Diagnose einer Sepsis bei Beurteilung in der HLA-Färbung erst ab dem Nachweis einer gewissen Anzahl an Mikroglia-Knoten gestellt werden. Ein definitiver Cut-off Wert konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht ermittelt werden, könnte jedoch ein Ziel nachfolgender Studien sein.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass wie vermutet die Immunhistochemie im Vergleich zur Routine HE-Färbung deutlich sensitiver in Bezug auf die Detektion von Mikroglia-Knoten ist. Dabei ist vor allem die HLA-Färbung für eine quantitative Analyse der Mikroglia-Knoten geeignet. Aufgrund der eher geringen Spezifität der immunhistochemischen Methode ist jedoch zu beachten, dass erst das Auftreten mehrerer Mikroglia-Knoten das Vorliegen einer Sepsis wahrscheinlich macht.

6.2.2 Immunhistochemische Darstellung diffuser aktivierter Mikroglia

In diversen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine experimentell durch LPS-Injektion induzierte Sepsis eine Aktivierung von Mikroglia im Gehirn zur Folge hat (Semmler et al. 2005, Hannestad et al. 2012, Henry et al. 2009). Darüber hinaus konnten Lemstra et al. eine verstärkte Aktivierung von Mikroglia auch im menschlichen Hirngewebe bei Patienten, welche unter dem klinischen Bild einer Sepsis verstarben, beobachten (Lemstra et al. 2007). In Anlehnung an die Ergebnisse vorausgegangener Studien sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls die diffuse Aktivierung von Mikroglia als Korrelat einer Sepsis untersucht werden. Dabei wurde im Bezug zu den bereits vorliegenden Ergebnissen hinsichtlich der Lokalisation von Mikrogliaknötchen erstmals gezielt der Bereich der Medulla oblongata analysiert.

6.2.2.1 Überlegenheit der morphometrischen Auswertung

In den verschiedenen Studien zur diffusen Aktivierung von Mikroglia im Rahmen der Sepsis kamen unterschiedliche Methoden zur Bewertung des Ausmaßes der Aktivierung zum Einsatz. So stellten Henry et al. eine verstärkte Aktivierung von Mikroglia bei experimentell induzierter Sepsis über die erhöhte mikrogliale Produktion spezifischer pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IL-10, fest (Henry et al. 2009). Diese Arbeit beruhte auf der Analyse von Homogenaten und die Morphologie der Mikroglia wurde nicht berücksichtigt. Andere Arbeiten nutzten hingegen zur Beurteilung der diffusen mikroglialen Aktivierung die verstärkte Expression bestimmter Oberflächenmarker. Lemstra et al. bewertete dabei die mikrogliale Immunreaktivität anhand eines semi-quantitativen Drei-Punkte-Scores, welcher sowohl die Anzahl als auch die Morphologie der Mikroglia als Zeichen der Aktivierung berücksichtigte (Lemstra et al. 2007). Im Gegensatz dazu quantifizierten Semmler et al. die mittels immunhistochemischer Färbung markierten Mikroglia anhand der Berechnung einer Zelldichte, welche die Anzahl der markierten Zellen pro Quadratmillimeter der untersuchten Region darstellte. Dabei konnte eine signifikant erhöhte Dichte der Mikroglia im Rahmen einer experimentell über LPS-Injektion induzierten Sepsis am Mausmodell gezeigt werden (Semmler et al. 2005). In Anlehnung an die Ergebnisse von Semmler et al. und der Tatsache, dass die Auswertung metrischer Daten als intervallskalierte Werte ein höheres statistisches Messniveau im Vergleich zu einem ordinalskalierten Score darstellt, wurde sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit für eine rein quantitative Auswertung der mikroglialen Immunreaktivität entschieden. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls die mikrogliale Zelldichte anhand der Anzahl markierter Zellen pro

Quadratmillimeter untersuchten Hirngewebes berechnet. Zusätzlich wurde analog zu Lemstra et al. auch die Morphologie der Zellen in die Bewertung der mikroglialen Aktivität einbezogen. Dies geschah allerdings nicht anhand eines Scores, sondern durch eine differenzierte Berechnung der Zelldichte für amoeboid und ramifizierte Mikroglia und der Bildung eines Quotienten aus beiden Zelltypen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist ebenfalls in der erhöhten statistischen Aussagekraft begründet.

6.2.2.2 Gesteigerte Mikroglia-dichte bei Sepsis

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass das Auftreten von Mikroglia-knötchen in der Medulla oblongata im Zusammenhang mit einer Sepsis steht, wurde nun untersucht, ob diese zusätzlich mit einer verstärkten diffusen Aktivierung von Mikroglia in diesem Bereich einhergehen. Dazu wurde die durchschnittliche Zelldichte der mittels HLA- und CD68-immunmarkierten Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe verglichen.

Während in der CD68-Färbung die Zelldichte immunpositiver Mikroglia in der Mikroglia-Gruppe signifikant höher als bei den Kontrollen war ($p=0,009$), konnten in der HLA-Färbung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Immunreaktivität festgestellt werden ($p=0,235$). Auch unter Berücksichtigung des klinischen Verdachts auf Sepsis, zeigte sich in der CD68-Färbung eine signifikant erhöhte diffuse Aktivierung von Mikroglia ($p=0,002$) in der Sepsisgruppe, während in der HLA-Färbung das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p=0,264$). Bei autopsischem Verdacht auf Sepsis konnten hingegen weder in der CD68- ($p=0,052$) noch in der HLA-Färbung ($p=0,114$) signifikante Unterschiede in der Mikroglia-dichte zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Schließlich erfolgte ein Vergleich des Patientenkollektivs mit Mikroglia-knötchen und klinischem sowie autopsischem Verdacht auf Sepsis (sicher Positive) mit denjenigen Patienten ohne Mikroglia-knötchen und ohne klinischen oder autopsischen Verdacht auf Sepsis (sicher Negative), wodurch die validesten Ergebnisse zu erwarten sind. Auch hierbei zeigte sich in der CD68-Färbung ein signifikanter Unterschied bezüglich der Mikroglia-dichte ($p=0,024$), während in der HLA-Färbung keine statistische Signifikanz erreicht wurde ($p=0,256$). Die vorliegenden Ergebnisse stimmen somit mit den Resultaten von Lemstra et al. überein. Auch hier wurde eine signifikant höhere Expression von CD68 bei den Sepsispatienten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt, während es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Immunreaktivität HLA-positiver Zellen gab. Allerdings bezogen sich die Ergebnisse hierbei auf den frontalen bzw. parietalen Kortex und die zugehörige subkortikale weiße Substanz (Lemstra et al. 2007). Darüber hinaus konnte in anderen Studien eine

signifikant gesteigerte mikrogliale Aktivierung im Rahmen einer Sepsis in weiteren Hirnregionen nachgewiesen werden, jedoch keine präferenzielle Betroffenheit der Medulla oblongata (Semmler et al. 2005, Henry et al. 2009).

In der Zusammenschau bestätigen die Ergebnisse somit die diffuse Aktivierung von Mikroglia als geeigneten Parameter zur Definition eines Kollektivs mit Sepsisverdacht. Darüber hinaus stellte sich die Medulla oblongata als weitere vulnerable Hirnregion im Rahmen der Sepsis heraus.

6.2.2.3 Ramifizierte und amoeboide Mikroglia

Während der Transformation der Mikroglia vom ruhenden in einen aktivierten Zustand kommt es neben Veränderungen des Immunphänotypes auch zu einer Veränderung in der Morphologie der Zellen. Dabei wandeln sich langgestreckte Zellen mit vielen feinen, verzweigten Fortsätzen in Makrophagen-ähnlich geformte Zellen um, die durch eine rundliche Form und das Fehlen von Fortsätzen gekennzeichnet sind (Kreutzberg 1996, Boche et al. 2013). Da somit auch die Morphologie der Zellen bis zu einem gewissen Grad Rückschlüsse auf den Aktivitätszustand zulässt, wurden neben der Berechnung der allgemeinen Mikroglia-dichte zusätzlich die Zelldichten ramifizierter und amoeboider Mikroglia sowie deren Verhältnis zueinander in Mikroglia- und Kontrollgruppe untersucht. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Lemstra et al., die einen deutlich erhöhten Anteil amoeboid geformter Mikroglia bei den Sepsispatienten zeigten, konnten in der vorliegenden Arbeit keine vergleichbaren Befunde erhoben werden. Lediglich in der HLA-Färbung war eine leichte Tendenz zu einem erhöhten Anteil amoeboider gegenüber ramifizierter Mikroglia in der Mikroglia- im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar, wobei jedoch keine statistische Signifikanz erreicht wurde ($p=0,706$).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Aktivitätszustand der Mikroglia nicht vordergründig durch die Morphologie bestimmt wird. Demnach scheint der Immunphänotyp, im Sinne einer gesteigerten CD68-Expression, gegenüber einer Veränderung der Morphologie von entscheidender Bedeutung für die Charakterisierung des aktiven Zustandes der Mikroglia zu sein. Eine Analyse des morphologischen Zustandes der Mikroglia allein ist somit zur Bewertung eines septischen Geschehens ungeeignet und sollte lediglich als Ergänzung in Erwägung gezogen werden.

6.2.2.4 Mikrogliadichte in unterschiedlichen Regionen der Medulla oblongata

In einer Studie von Sonnevile et al. wird der Nervus vagus als mögliche Bahn für die Weiterleitung von Entzündungsreaktionen in den Hirnstamm beschrieben, was eine akzentuierte Aktivierung von Mikroglia vor allem im Bereich des Tractus solitarius vermuten lässt (Sonneville et al. 2013). Um zu untersuchen, ob sich der Tractus solitarius hinsichtlich der Aktivierung von Mikroglia gegenüber den anderen Strukturen hervorhebt oder ob diese im Rahmen der Sepsis ebenfalls vulnerable Areale darstellen, wurde die Zelldichte immunpositiver Mikroglia für jeweils fünf mikroskopisch voneinander abgrenzbare Strukturen berechnet. Bei den Strukturen handelte es sich um die Pyramidenbahn, die Olive, die olivocerebellaren Fasern, den Tractus solitarius sowie die Kerngebiete der Rautengrube. Ziel der Untersuchung war es die Medulla oblongata hinsichtlich ihrer Eignung zur Beurteilung eines septischen Geschehens weiter einzugrenzen, um den Fokus zukünftiger neuropathologischer Untersuchungen auf besonders vulnerable Strukturen für Veränderungen im Rahmen einer Sepsis richten zu können.

Tractus solitarius

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen stellte sich heraus, dass unabhängig von der Färbung und Gruppeneinteilung die höchste Zelldichte immunpositiver Mikroglia im Bereich des Tractus solitarius zu verzeichnen war. Beim Vergleich der Mikrogliadichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe konnte zudem eine signifikant höhere Zelldichte CD68-positiver Mikroglia bei den Patienten der Mikroglia-Gruppe gegenüber den Kontrollen festgestellt werden ($p=0,033$), während sich in der HLA-Färbung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten ($p=0,784$). Diese Ergebnisse scheinen die von Sonnevile et al. aufgestellte Hypothese der Weiterleitung einer systemischen Entzündungsreaktion in das Gehirn über den Nervus Vagus zu unterstützen. Danach soll der Nerv über axonale Zytokinrezeptoren viszerale Entzündungen detektieren und diese als afferente Signale in den Hirnstamm zum Tractus solitarius weiterleiten, was dort wiederum zu einer Aktivierung von Mikroglia führt (Sonneville et al. 2013). Allerdings konnte der subjektive Eindruck der Heterogenität bezüglich der Mikrogliadichte innerhalb der Medulla oblongata und somit auch eine Akzentuierung im Bereich des Tractus solitarius nicht bestätigt werden. Die Korrelation der Zelldichten zwischen den verschiedenen Regionen war auf einem Niveau von $p<0,01$ statistisch hoch signifikant. Zudem korrelierte die Mikrogliadichte jeder einzelnen Region mit der durchschnittlichen Mikrogliadichte der gesamten Medulla oblongata

signifikant auf dem gleichen Niveau. Obwohl also der absolute Wert der Mikroglia-dichte im Bereich des Tractus solitarius am höchsten war, ist die Differenz im Vergleich zu den anderen Regionen statistisch nicht signifikant. So geht eine hohe Mikroglia-dichte eines Areales auch mit einer hohen Mikroglia-dichte in den anderen Bereichen einher. Ebenso konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Zelldichte der ramifizierten und amoeboiden Mikroglia, unabhängig von der Region, festgestellt werden.

Pyramidenbahn

Die Pyramidenbahn könnte bei absteigenden Degenerationen, wie sie beispielsweise im Rahmen von zerebralen Ischämien (Stovring und Fernando 1983, Kuhn et al. 1988) und diversen Motoneuronenerkrankungen (Mascalchi et al. 1995) auftreten, falsch positive Ergebnisse zeigen, da es bei nahezu allen pathologischen Veränderungen im ZNS zu einer Aktivierung von Mikroglia kommt (Kreutzberg 1996). Aufgrund dessen muss eine erhöhte Mikroglia-dichte im Bereich der Pyramidenbahn nicht zwangsläufig für ein septisches Geschehen sprechen. Eine absteigende Degeneration könnte somit die verstärkte Aktivierung im Rahmen der Sepsis maskieren und Grund dafür sein, dass im Bereich der Pyramidenbahn keine signifikanten Unterschiede zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe gefunden werden. Die im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse scheinen diese Hypothese zu bestätigen. In der CD68-Färbung konnte im Gegensatz zum Tractus solitarius keine signifikant erhöhte Mikroglia-dichte in der Mikroglia- gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden ($p=0,066$), während die Zelldichte HLA-positiver Mikroglia in der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,043$) war. Die Region der Pyramidenbahn scheint somit für neuropathologische Betrachtungen im Rahmen einer Sepsis weniger geeignet zu sein, da zahlreiche ZNS-Pathologien mit histopathologischen Veränderungen der Pyramidenbahn einhergehen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in vier von fünf der untersuchten Arealen innerhalb der Medulla oblongata eine signifikant höhere Zelldichte CD68-positiver Mikroglia in der Mikroglia-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Lediglich im Bereich der Pyramidenbahn wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden, was in einer erhöhten Vulnerabilität dieser Struktur gegenüber diversen Pathologien begründet sein kann (Kuhn et al. 1988, Mascalchi et al. 1995, Stovring und Fernando 1983). Außerdem konnte anhand der Ergebnisse die vermutete Akzentuierung im Bereich des Tractus solitarius (Sonnevile et al. 2013) trotz höchster absoluter Zelldichte statistisch nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte der gesamte Bereich der Medulla

oblongata, mit Ausnahme der Pyramidenbahn, eine Sepsis-assoziierte verstärkte Aktivierung von Mikroglia und kann somit zur Beurteilung eines septischen Geschehens im Rahmen neuropathologischer Untersuchungen empfohlen werden.

6.2.2.5 Abschließende Bewertung der Marker zur Darstellung diffuser aktivierter Mikroglia

Vergleich der Expression von CD68 mit HLA

Bei den morphometrischen Untersuchungen erfolgte die Identifizierung der Mikroglia jeweils unter Verwendung eines Antikörpers gegen CD68 und HLA-Klasse-II-Antigene, welche als Marker für aktivierte Mikroglia bereits weit verbreitet eingesetzt werden (Zotova et al. 2011). Dabei charakterisiert CD68 als lysosomales Membranprotein vor allem hoch aktive, phagozytierende Mikroglia (Boche et al. 2013), während HLA als antigenpräsentierender Proteinkomplex nicht ausschließlich von aktivierten, sondern auch von ruhenden Mikroglia exprimiert wird (Kim und de Vellis 2005). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass bei der Anwendung des HLA-Antikörpers nicht nur aktivierte Mikroglia, wie sie im Rahmen eines septischen Geschehens zu erwarten sind, markiert wurden, sondern vielmehr auch die residente Mikroglia-Population im gesunden Hirn. Außerdem konnte in vorausgegangenen Studien gezeigt werden, dass auch Alterungsprozesse zu einer erhöhten HLA-Klasse-II Expression führen und HLA deshalb zusätzlich oder sogar anstelle eines Aktivierungsmarkers als Marker für die Zellalterung bzw. -reifung in Betracht gezogen werden sollte (Conde und Streit 2006). Da das durchschnittliche Alter des im Rahmen der Arbeit untersuchten Patientenkollektivs mit 67,2 Jahren relativ hoch ist, könnte die deutlich erhöhte Mikroglia-dichte HLA-positiver Zellen gegenüber CD68-positiver Zellen durchaus mit dem Alter der Patienten im Zusammenhang stehen. Die unterschiedliche Spezifität der beiden Färbemethoden hinsichtlich der Identifizierung aktivierter Mikroglia sowie der potentielle Einfluss des Alters auf die HLA-Expression könnten somit die Unterschiede hinsichtlich der Mikroglia-dichte zwischen beiden Färbungen erklären bzw. der Grund dafür sein, dass in der HLA- im Gegensatz zur CD68-Färbung keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Patienten der Mikroglia-Gruppe und den Kontrollen gefunden werden konnte. Die Ergebnisse spiegeln somit auf der einen Seite eine verstärkte Aktivierung von Mikroglia im Rahmen der Sepsis wieder, wie anhand der CD68-Immunfärbung gezeigt werden konnte, während sie andererseits zusätzlich den Effekt des Alterns darstellen, welcher durch eine gesteigerte HLA-Immunreaktivität im Vergleich zu CD68 zum Ausdruck kommt. Weitere Betrachtungen zu einem möglichen Einfluss des Alters auf die Messdaten finden sich in Kapitel 6.3.1.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD68 als Marker für diffus aktivierte Mikroglia im Rahmen der Sepsis gegenüber HLA besser geeignet ist. Zwar ist die Immunreaktivität in der CD68-Färbung deutlich geringer, dafür lässt sich eine signifikant erhöhte Expression des Antigens bei den Patienten der Mikroglia-Gruppe nachweisen. Die gesteigerte Expression von HLA-Antigen scheint hingegen weniger spezifisch für aktivierte Mikroglia im Rahmen der Sepsis zu sein bzw. zusätzlich durch andere Faktoren, wie das Alter, beeinflusst zu werden.

Expression von CD163

Andere Arbeitsgruppen haben in der Vergangenheit erfolgreich Antikörper gegen CD163 zur Darstellung perivaskulärer Makrophagen bzw. Makrophagen-ähnlicher Mikroglia in Bereichen mit gestörter Blut-Hirn-Schranke eingesetzt (Lau et al. 2004, Boche et al. 2013). Dem CD163-Protein werden dabei immunregulatorische Funktionen zugeschrieben. Zudem ist die Expression mit der Resolutionsphase der Inflammation sowie der alternativen Aktivierung von Makrophagen assoziiert (Komohara et al. 2006). Im Hirnparenchym wurde CD163 als Marker für Mikroglia bereits im Rahmen einiger Erkrankungen des ZNS mit entzündlicher Komponente untersucht. So konnte eine Expression zum Beispiel bei HIV-Enzephalitis (Roberts et al. 2004), Multipler Sklerose (Fabrick et al. 2005) und traumatischer Hirnschädigung (Zhang et al. 2012) nachgewiesen werden. Studien hinsichtlich der CD163 Expression von Mikroglia im Rahmen der Sepsis sind derzeit nicht bekannt. Die Analyse der in dieser Arbeit angefertigten Schnitte lieferte allerdings häufig negative Reaktionen, weshalb sich diese Färbung nicht für die geplante morphometrische Auswertung eignete. CD163 scheint somit bei fehlender Sensitivität hinsichtlich der Detektion aktivierter Mikroglia im Rahmen der Sepsis keine echte Alternative für den routinemäßigen Einsatz darzustellen.

6.3 Einfluss von Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen

6.3.1 Patientenalter und Geschlecht

Zahlreiche Studien zu altersbedingten Veränderungen konnten eine Zunahme der Expression von Antigenen zeigen, die normalerweise im Zusammenhang mit der Aktivierung von Mikroglia im Rahmen einer akuten ZNS-Schädigung stehen (Conde und Streit 2006). Dabei wurde vor allem eine mit dem Alter zunehmende Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen der Mikroglia bei Ratten (Perry et al. 1993), Affen (Sloane et al. 1999) und auch im menschlichen Gehirn (DiPatre und Gelman 1997) festgestellt. Eine Studie am Mausmodell zeigte dabei eine deutlich stärker ausgeprägte HLA-Expression in der weißen Substanz im Vergleich zur grauen Substanz (Long et al. 1998). Es wird vermutet, dass die gesteigerte HLA-Expression im Alter eine immunphänotypische Veränderung der bereits existierenden

Mikroglia-Population darstellt, da es bislang keine Beweise für eine erhöhte Zellzahl gibt. Zusätzlich zu HLA-Klasse-II-Antigenen, konnte auch eine verstärkte Expression von anderen Molekülen, wie z.B. dem ED1-Makrophagen-Antigen als Homolog zum menschlichen CD68-Antigen, auf Mikroglia-Zellen im alternden ZNS von Ratten gefunden werden (Kullberg et al. 2001). Da das durchschnittliche Alter des untersuchten Patientenkollektivs als relativ hoch anzusehen ist und beim Vergleich der Immunfärbungen festgestellt werden konnte, dass die Zelldichte der HLA-markierten Mikroglia im Durchschnitt um den Faktor 4 höher war als die Zelldichte CD68-positiver Mikroglia, wurde der mögliche Einfluss des Alters auf die Messdaten untersucht. Dazu wurde eine statistische Korrelation des Alters mit der Mikroglia-dichte beider morphologischer Zelltypen und jeder einzelnen Region innerhalb der Medulla oblongata durchgeführt. In der CD68-Färbung konnte dabei weder in der Mikroglia- noch in der Kontrollgruppe eine signifikante Korrelation festgestellt werden, sodass sich eine verstärkte Expression von CD68-Antigen im Alter anhand dieser Ergebnisse nicht bestätigen lässt. In der HLA-Färbung ergab sich hingegen in der Mikroglia-Gruppe eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Alter und Mikroglia-dichte im Bereich des Tractus solitarius. Dabei war die Korrelation sowohl zwischen Alter und ramifizierter bzw. amoeboider Mikroglia-dichte als auch zwischen Alter und allgemeiner Mikroglia-dichte auf einem Niveau von $p < 0,05$ statistisch signifikant. Diese Ergebnisse können die in der Literatur beschriebene erhöhte HLA-Expression im Alter somit nur für den Bereich des Tractus solitarius bestätigen. Allerdings gilt es zu beachten, dass die Korrelation lediglich in der Mikroglia-Gruppe nachgewiesen wurde und somit eine verstärkte Expression des HLA-Antigens im Rahmen der Sepsis durchaus einen Zusammenhang mit dem Alter vorgetäuscht haben könnte.

Zusätzlich erfolgte eine statistische Analyse zum Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Geschlechtern. Bislang gibt es jedoch keine Erkenntnisse bezüglich Geschlechts-abhängiger Unterschiede hinsichtlich der diffusen Aktivierung von Mikroglia. Erwartungsgemäß ergaben auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Mikroglia-dichte zwischen Männern und Frauen, unabhängig von Färbung und betrachteter Region.

6.3.2 Morbus Alzheimer

In der Literatur wird eine diffuse Aktivierung von Mikroglia bei diversen neurodegenerativen Erkrankungen, unter anderem auch im Rahmen der Alzheimer-Krankheit, beschrieben. McGeer et al. beschrieben dabei das vermehrte Auftreten HLA-positiver Mikroglia im gesamten Kortex von Alzheimerpatienten mit besonders hoher Konzentration in den Bereichen mit senilen β -Amyloid-Plaques (McGeer et al. 1987). Auch Mattiace et al. konnten bei Alzheimerpatienten eine Hochregulation von HLA-Antigenen auf den Mikroglia im Sinne einer Aktivierung nachweisen (Mattiace et al. 1990). DiPatre et al. wiesen ebenfalls eine signifikant höhere Zelldichte aktivierter Mikroglia im Bereich des Hippocampus bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu Kontrollpatienten nach (DiPatre und Gelman 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bestandteile der senilen Plaques, wie z.B. das Amyloid-Precursor-Protein, eine Aktivierung von Mikroglia bewirken (Schubert et al. 2000). Während bisher die Aktivierung von Mikroglia im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung lediglich als Reaktion auf die degenerativen Veränderungen gesehen wurde, sind sie aktuellen Erkenntnissen zufolge evtl. auch von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung. So lassen neue Untersuchungen einen Einfluss der von aktivierten Mikroglia freigesetzten Zytokine auf die Bildung von β -Amyloid-Plaques und Neurofibrillen vermuten (Heneka et al. 2010).

Bei der Analyse der Begleiterkrankungen des untersuchten Patientenkollektivs fiel auf, dass fast ein Viertel der Patienten (23%) an einem Morbus Alzheimer litt. Um einen möglichen Einfluss dieser Erkrankung auf die Messdaten zu untersuchen, wurde das gesamte Patientenkollektiv hinsichtlich des Vorliegens einer Sepsis und/oder der Alzheimer-Krankheit in vier Gruppen unterteilt und die durchschnittliche Mikroglia-dichte zwischen den einzelnen Gruppen sowohl in der HLA- als auch in der CD68-Färbung verglichen. Bei einem tatsächlichen Einfluss der Erkrankung auf die ermittelte Zelldichte der Mikroglia wäre die höchste Zelldichte bei Patienten sowohl mit Sepsis als auch Alzheimer (Gruppe 4) zu erwarten gewesen, während bei Patienten ohne Sepsis und Alzheimer (Gruppe 1) die Mikroglia-dichte im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich geringer hätte sein müssen. Die Untersuchungen ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen, weder bezüglich der Zelldichte der HLA-markierten Mikroglia ($p=0,535$) noch der CD68-positiven Zellen ($p=0,074$). Auch eine klare Tendenz der Messwerte war nicht zu erkennen. Die Ergebnisse sprechen somit gegen eine Beeinflussung der mikroglialen

Zelldichte durch das gleichzeitige Vorliegen einer Alzheimer-Krankheit und für eine spezifische Erhöhung der Mikroglia-dichte im Rahmen der Sepsis.

6.3.3 Zerebrale Ischämien

Mikroglia spielen als die residenten Makrophagen des Gehirns bei diversen Schädigungen des ZNS, wie zum Beispiel im Rahmen von Infektionen, Traumata oder Ischämien, eine bedeutende Rolle (Thomas 1992). Wood et al. beschreiben eine Aktivierung von Mikroglia als Folge einer zerebralen Ischämie, welche unter anderem zur Freisetzung zahlreicher zytotoxischer Substanzen führt (Wood 1995). Dabei wird vermutet, dass die inflammatorische Reaktion durch Aktivierung von Mikroglia wiederum zu einer Schädigung des ZNS und somit zur Verstärkung der Ischämie beitragen kann (Becker 1998). Kosel et al. stellten bei Patienten mit Mediainfarkt eine verstärkte Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche der Mikroglia im Bereich der Pyramidenbahn fest (Kosel et al. 1997). Dass eine zerebrale Ischämie zu absteigenden Degenerationen der Pyramidenbahn führt, ist hinreichend bekannt. Stovring und Fernando konnten bei Patienten mit alten Hirninfarkten Atrophien im ipsilateralen Mittelhirn und Pons mittels CT-Untersuchungen nachweisen (Stovring und Fernando 1983) und Kuhn et al. stellten im MRT sogenannte Waller'sche Degenerationen im Bereich der Pyramidenbahn bei Patienten mit zerebralen Infarkten dar (Kuhn et al. 1988).

Da als zweithäufigste Begleiterkrankung bei ca. 20% der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten eine zerebrale Ischämie vorlag und diese der Literatur zufolge ebenfalls zu einer Aktivierung von Mikroglia im Bereich der Pyramidenbahn führen kann, wurde ein möglicher Einfluss auf die Messdaten untersucht. Das Vorgehen war dabei analog zu den Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Alzheimer-Erkrankung. Es erfolgte je nach Vorliegen einer Sepsis und/oder einer zerebralen Ischämie eine Einteilung der Patienten in vier Gruppen und ein anschließender Vergleich der Mikroglia-dichte im Bereich der Pyramidenbahn. Die statistische Analyse der Daten ergab dabei keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zelldichte zwischen den einzelnen Gruppen, weder in der HLA- (p=0,110) noch in der CD68-Färbung (p=0,146). Auch eine Tendenz der Ergebnisse im Sinne einer bei Patienten ohne Sepsis und Ischämie geringeren Mikroglia-dichte im Vergleich zu den anderen Gruppen oder eine erhöhte Mikroglia-dichte bei Vorliegen von Sepsis und Ischämie konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse sprechen somit gegen eine Beeinflussung der mikroglialen Zelldichte im Bereich der Pyramidenbahn durch zerebrale Ischämien und für eine spezifische Erhöhung der Mikroglia-dichte im Rahmen der Sepsis.

7 Schlussfolgerungen

Insgesamt konnten bei ca. 6% aller Hirnautopsien über einen Zeitraum von 6 Jahren Mikrogliaknötchen in den Routine-HE-Schnitten nachgewiesen werden. Dabei stellte sich die Medulla oblongata als Prädilektionsort für das Auftreten von Mikrogliaknötchen heraus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an einem größeren Patientenkollektiv gezeigt, dass das Auftreten von Mikrogliaknötchen sowohl mit dem klinischen Verdacht auf eine Sepsis als auch mit autoptischen Hinweisen auf eine Sepsis assoziiert ist und somit als Parameter zur postmortalen Beurteilung einer Sepsis herangezogen werden kann. Dennoch konnten viele Unsicherheiten bei der klinischen, autoptischen und neuropathologischen Untersuchung hinsichtlich der Sepsisdiagnose festgestellt werden, was vor allem den nur unzureichend definierten Kriterien bzw. deren Anwendung geschuldet ist. Wünschenswert für die Zukunft wären daher Parameter, die eine noch höhere Spezifität und vor allem Sensitivität für die Diagnose einer Sepsis aufweisen.

Unter Einsatz immunhistochemischer Methoden konnte das Auffinden von Mikrogliaknötchen erleichtert werden. Dabei erwies sich HLA als geeignetster Marker zur Darstellung und Quantifizierung von Mikrogliaknötchen. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich erhöhte Sensitivität der Immunhistochemie gegenüber der Routine-HE-Färbung, allerdings macht aufgrund der geringeren Spezifität erst das Auftreten mehrerer Mikrogliaknötchen das Vorliegen einer Sepsis wahrscheinlich.

Darüber hinaus wurde mittels morphometrischer Verfahren gezeigt, dass im Rahmen der Sepsis zusätzlich eine diffuse Aktivierung von Mikroglia im Bereich der Medulla oblongata stattfindet. Hierbei erwies sich CD68 als geeignetster Marker. Allerdings konnte bislang keine ideale Färbemethode zur spezifischen Darstellung aktivierter Mikroglia im Rahmen der Sepsis gefunden werden. Die Untersuchungen bezüglich der morphologischen Veränderungen der Mikroglia im Rahmen der Sepsis zeigten, dass diese gegenüber einer gesteigerten Antigen-Expression für die Charakterisierung des aktiven Zustandes der Mikroglia allenfalls von untergeordneter Bedeutung sind. Deshalb sollten sich künftige Forschungsansätze auf die Suche eines Markers konzentrieren, welcher eine bessere Unterscheidung zwischen residenter und aktivierter Mikroglia zulässt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patientenalter und Geschlecht sowie häufige zentralnervöse Begleiterkrankungen, wie Morbus Alzheimer und zerebrale Ischämien, auf die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen im Bereich der Medulla oblongata keinen bemerkenswerten Einfluss hatten.

Die vorliegende Pilotstudie demonstriert erstmals den Stellenwert von Mikrogliaknötchen und diffuser aktivierter Mikroglia im Rahmen der postmortalen Sepsisdiagnostik. Die morphometrische Auswertung stellt dabei eine technisch sehr aufwändige Methode dar und unterliegt dennoch einer hohen subjektiven Komponente. Demgegenüber steht mit dem Auszählen von Mikrogliaknötchen eine vereinfachte Technik und geeignete Alternative zur Beurteilung eines septischen Geschehens im ZNS zur Verfügung. Dabei erscheint eine Fokussierung auf den Bereich der Medulla oblongata aus ökonomischen Gesichtspunkten für eine orientierende Untersuchung gerechtfertigt. Die in der Arbeit dargestellten Sensitivitäten und Spezifitäten erlauben jedoch aktuell noch keine abschließende Klassifikation hinsichtlich der Reaktion des ZNS auf ein septisches Geschehen.

Weiterführende Untersuchungen könnten sich auf die Suche nach besseren immunhistochemischen Markern beziehen. Darüber hinaus könnten im Rahmen einer prospektiven Studie die hier dargestellten neuropathologischen Befunde mit valideren klinischen und allgemeinpathologischen Sepsis-Kriterien korreliert werden.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R. 2002. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*, 28 (2):108-121.
- Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. 2008. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int*, 52 (3):447-456.
- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 117 (2):145-152.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29 (7):1303-1310.
- Avwioro G. 2011. Histochemical Uses Of Haematoxylin- A Review. *International Journal of research and Reviews in Applied Sciences*.
- Bankl H. 2002. *Arbeitsbuch Pathologie II: Allgemeine Pathologie*. Wien: Facultas-Verlag.
- Baron M, Gallego A. 1972. The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 128 (1):42-57.
- Bartynski WS, Boardman JF, Zeigler ZR, Shaddock RK, Lister J. 2006. Posterior reversible encephalopathy syndrome in infection, sepsis, and shock. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27 (10):2179-2190.
- Basler T, Meier-Hellmann A, Bredle D, Reinhart K. 2002. Amino acid imbalance early in septic encephalopathy. *Intensive Care Med*, 28 (3):293-298.
- Bates DW, Sands K, Miller E, Lanken PN, Hibberd PL, Graman PS, Schwartz JS, Kahn K, Snyderman DR, Parsonnet J, Moore R, Black E, Johnson BL, Jha A, Platt R. 1997. Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J Infect Dis*, 176 (6):1538-1551.
- Becker KJ. 1998. Inflammation and acute stroke. *Curr Opin Neurol*, 11 (1):45-49.
- Bergeron N, Dubois MJ, Dumont M, Dial S, Skrobik Y. 2001. Intensive Care Delirium Screening Checklist: evaluation of a new screening tool. *Intensive Care Med*, 27 (5):859-864.
- Bitsch A, Nau R, Hilgers RA, Verheggen R, Werner G, Prange HW. 1996. Focal neurologic deficits in infective endocarditis and other septic diseases. *Acta Neurol Scand*, 94 (4):279-286.
- Bleck TP, Smith MC, Pierre-Louis SJ, Jares JJ, Murray J, Hansen CA. 1993. Neurologic complications of critical medical illnesses. *Crit Care Med*, 21 (1):98-103.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8 (1):57-69.
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*, 125 (1-2):279-285.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JA. 2013. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39 (1):3-18.
- Bolton CF, Young GB, Zochodne DW. 1993. The neurological complications of sepsis. *Ann Neurol*, 33 (1):94-100.
- Bone RC. 1991. Let's agree on terminology: definitions of sepsis. *Crit Care Med*, 19 (7):973-976.

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.
- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. 1995. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*, 274 (12):968-974.
- Brunkhorst FM. 2006. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41 (1):43-44.
- Budka H. 1991. Neuropathology of human immunodeficiency virus infection. *Brain Pathol*, 1 (3):163-175.
- Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. 2004. Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, 53 (2):344-354.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.
- Conde JR, Streit WJ. 2006. Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (3):199-203.
- Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. 1984. The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38 (3):293-298.
- Dako. 2006/2007. Catalyzed Signal Amplification (CSA) System For Use with Mouse Primary Antibodies
- De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M, Rivolta A, Biondi A, Zanesco L, Basso G. 2000. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia*, 14 (7):1225-1231.
- Del Rio-Hortega P. 1932. Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Penfield, W., ed.). New-York: Hoeber, P.B.
- Dinarello CA. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112 (6 Suppl):321S-329S.
- DiPatre PL, Gelman BB. 1997. Microglial cell activation in aging and Alzheimer disease: partial linkage with neurofibrillary tangle burden in the hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56 (2):143-149.
- Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. 2007. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med*, 33 (6):941-950.
- Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL. 1996. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA*, 275 (6):470-473.
- Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK. 2009. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, 113 (4):887-892.
- Fabrick BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P, Dijkstra CD. 2005. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*, 51 (4):297-305.
- Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, et al. 1993. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol*, 142 (5):1359-1372.

- Ferro JM. 2003. Cardioembolic stroke: an update. *Lancet Neurol*, 2 (3):177-188.
- Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP. 2011. Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16:2326-2341.
- Gehrmann J, Banati RB, Kreutzberg GW. 1993. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol*, 48 (2):189-198.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330 (6005):841-845.
- Goyert SM. 1998. CD68 Workshop Panel report Kobe, Japan: Garland Publishing.
- Gustot T. 2011. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care*, 17 (2):153-159.
- Hannestad J, Gallezot JD, Schafbauer T, Lim K, Kloczynski T, Morris ED, Carson RE, Ding YS, Cosgrove KP. 2012. Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [(1)(1)C]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. *Neuroimage*, 63 (1):232-239.
- Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J, Geneva Sepsis N. 2001. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (3):396-402.
- Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. 2010. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 117 (8):919-947.
- Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*, 23 (3):309-317.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29 (4):577-580.
- Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. 2009. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med*, 37 (10 Suppl):S331-336.
- Jackson AC, Gilbert JJ, Young GB, Bolton CF. 1985. The encephalopathy of sepsis. *Can J Neurol Sci*, 12 (4):303-307.
- Jeppsson B, Freund HR, Gimmon Z, James JH, von Meyenfeldt MF, Fischer JE. 1981. Blood-brain barrier derangement in sepsis: cause of septic encephalopathy? *Am J Surg*, 141 (1):136-142.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. 4 Aufl. New-York: McGraw-Hill Professional.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA. 2001. Origin of microglia. *Microsc Res Tech*, 54 (1):2-9.
- Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*, 81 (3):302-313.
- Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, Kawamura K, Kiyota E, Sakashita N, Araki N, Takeya M. 2006. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J Histochem Cytochem*, 54 (7):763-771.
- Kosel S, Egensperger R, Bise K, Arbogast S, Mehraein P, Graeber MB. 1997. Long-lasting perivascular accumulation of major histocompatibility complex class II-positive lipophages in the spinal cord of stroke patients: possible relevance for the immune privilege of the brain. *Acta Neuropathol*, 94 (6):532-538.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19 (8):312-318.

- Kreymann G, Wolf M. 1996. [History and definition of sepsis--do we need new terminology?]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 31 (1):9-14.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409 (6817):198-201.
- Kuhn MJ, Johnson KA, Davis KR. 1988. Wallerian degeneration: evaluation with MR imaging. *Radiology*, 168 (1):199-202.
- Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B. 2001. Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res*, 899 (1-2):169-186.
- Kumar LG, Rudbeck L. 2009. Education Guide Immunohistochemical staining methods North America, Carpinteria, California: Dako Corporation.
- Landry DW, Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*, 345 (8):588-595.
- Lang G. 2013. Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2 Aufl. Wien: Springer-Verlag.
- Lassmann H, Hickey WF. 1993. Radiation bone marrow chimeras as a tool to study microglia turnover in normal brain and inflammation. *Clin Neuropathol*, 12 (5):284-285.
- Lau SK, Chu PG, Weiss LM. 2004. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*, 122 (5):794-801.
- Lemstra AW, Groen in't Woud JC, Hoozemans JJ, van Haastert ES, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, van Gool WA. 2007. Microglia activation in sepsis: a case-control study. *J Neuroinflammation*, 4:4.
- Lewis PD. 1968. The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain*, 91 (4):721-736.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP. 1980. Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol*, 193 (3):631-657.
- Long JM, Kalehua AN, Muth NJ, Calhoun ME, Jucker M, Hengemihle JM, Ingram DK, Mouton PR. 1998. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiol Aging*, 19 (5):497-503.
- Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungtatscher A, Pavan R, Merlini A. 2003. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med*, 31 (6):1737-1741.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348 (16):1546-1554.
- Mascalchi M, Salvi F, Valzania F, Marcacci G, Bartolozzi C, Tassinari CA. 1995. Corticospinal tract degeneration in motor neuron disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, 16 (4 Suppl):878-880.
- Masuda J, Yutani C, Waki R, Ogata J, Kuriyama Y, Yamaguchi T. 1992. Histopathological analysis of the mechanisms of intracranial hemorrhage complicating infective endocarditis. *Stroke*, 23 (6):843-850.
- Mattiace LA, Davies P, Dickson DW. 1990. Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. *Am J Pathol*, 136 (5):1101-1114.
- McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. 1987. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*, 79 (1-2):195-200.
- Morgello S, Cho ES, Nielsen S, Devinsky O, Petito CK. 1987. Cytomegalovirus encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: an autopsy study of 30 cases and a review of the literature. *Hum Pathol*, 18 (3):289-297.

- Navarrete CV. 2000. The HLA system in blood transfusion. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13 (4):511-532.
- Nebuloni M, Pellegrinelli A, Ferri A, Tosoni A, Bonetto S, Zerbi P, Boldorini R, Vago L, Costanzi G. 2000. Etiology of microglial nodules in brains of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Neurovirol*, 6 (1):46-50.
- Nguyen DN, Spapen H, Su F, Schiettecatte J, Shi L, Hachimi-Idrissi S, Huyghens L. 2006. Elevated serum levels of S-100beta protein and neuron-specific enolase are associated with brain injury in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, 34 (7):1967-1974.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308 (5726):1314-1318.
- Nissl F. 1899. Ueber einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch Psych*, 32:1-21.
- Pendlebury WW, Perl DP, Munoz DG. 1989. Multiple microabscesses in the central nervous system: a clinicopathologic study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 48 (3):290-300.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15 (2):313-326.
- Perry VH, Matyszak MK, Fearn S. 1993. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*, 7 (1):60-67.
- Pey P, Pearce RK, Kalaitzakis ME, Griffin WS, Gentleman SM. 2014. Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2:21.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. 2011. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat Med*, 17 (1):64-70.
- Prange HW. 2006. Die Septische Herdenzephalitis. *Intensivmed*, 43:85-93.
- Pruitt AA, Rubin RH, Karchmer AW, Duncan GW. 1978. Neurologic complications of bacterial endocarditis. *Medicine (Baltimore)*, 57 (4):329-343.
- Pulford KA, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, Mason DY. 1989. KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol*, 42 (4):414-421.
- Radzun HJ, Kreipe H, Bodewadt S, Hansmann ML, Barth J, Parwaresch MR. 1987. Ki-M8 monoclonal antibody reactive with an intracytoplasmic antigen of monocyte/macrophage lineage. *Blood*, 69 (5):1320-1327.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Sepsis S, German Interdisciplinary Association of Intensive C, Emergency M. 2010. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci*, 8:Doc14.
- Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfig N. 2005. Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb Cortex*, 15 (7):938-949.
- Roberts ES, Masliah E, Fox HS. 2004. CD163 identifies a unique population of ramified microglia in HIV encephalitis (HIVE). *J Neuropathol Exp Neurol*, 63 (12):1255-1264.
- Romeike BFM, Winning J, Petersen I. 2011. Cerebral microglial nodules and sepsis. *Clinical Neuropathol*, 30 (5):264.

- Schubert P, Morino T, Miyazaki H, Ogata T, Nakamura Y, Marchini C, Ferroni S. 2000. Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 903:24-33.
- Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. 2005. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*, 30 (2-3):144-157.
- Sessler CN, Gosnell MS, Grap MJ, Brophy GM, O'Neal PV, Keane KA, Tesoro EP, Elswick RK. 2002. The Richmond Agitation-Sedation Scale: validity and reliability in adult intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (10):1338-1344.
- Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Francoise G. 2004. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol*, 14 (1):21-33.
- Sharshar T, Carlier R, Bernard F, Guidoux C, Brouland JP, Nardi O, de la Grandmaison GL, Aboab J, Gray F, Menon D, Annane D. 2007. Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study. *Intensive Care Med*, 33 (5):798-806.
- Shenep JL, Mogan KA. 1984. Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for experimental gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis*, 150 (3):380-388.
- Singh S, Metz I, Amor S, van der Valk P, Stadelmann C, Bruck W. 2013. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol*, 125 (4):595-608.
- Sloane JA, Hollander W, Moss MB, Rosene DL, Abraham CR. 1999. Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiol Aging*, 20 (4):395-405.
- Sonneville R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, Chretien F, Sharshar T. 2013. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*, 3 (1):15.
- Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, Schein RM, Wilson MF, Sheagren JN, Hinshaw LB. 1990. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med*, 18 (8):801-806.
- Sprung CL, Cerra FB, Freund HR, Schein RM, Konstantinides FN, Marcial EH, Pena M. 1991. Amino acid alterations and encephalopathy in the sepsis syndrome. *Crit Care Med*, 19 (6):753-757.
- Stovring J, Fernando LT. 1983. Wallerian degeneration of the corticospinal tract region of the brain stem: demonstration by computed tomography. *Radiology*, 149 (3):717-720.
- Streit WJ, Kreutzberg GW. 1987. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol*, 16 (2):249-260.
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA. 1995. The brain's immune system. *Sci Am*, 273 (5):54-55, 58-61.
- Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. 2009. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol*, 85 (3):352-370.
- Tauber SC, Bunkowski S, Bruck W, Nau R. 2011. Septic metastatic encephalitis: coexistence of brain damage and repair. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37 (7):768-776.
- Teeling JL, Perry VH. 2009. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience*, 158 (3):1062-1073.
- Terborg C. 2012. [Septic encephalopathy]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 107 (8):629-633.
- Terborg C, Schummer W, Albrecht M, Reinhart K, Weiller C, Rother J. 2001. Dysfunction of vasomotor reactivity in severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, 27 (7):1231-1234.
- Thomas C, Büttner R. 2003. *Allgemeine Pathologie: mit 15 Tabellen*. Stuttgart: Schattauer Verlag.

- Thomas WE. 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev*, 17 (1):61-74.
- Toklu HZ, Uysal MK, Kabasakal L, Sirvanci S, Ercan F, Kaya M. 2009. The effects of riluzole on neurological, brain biochemical, and histological changes in early and late term of sepsis in rats. *J Surg Res*, 152 (2):238-248.
- Topoll HH, Zwadlo G, Lange DE, Sorg C. 1989. Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis. *J Periodontal Res*, 24 (2):106-112.
- Truman B, Ely EW. 2003. Monitoring delirium in critically ill patients. Using the confusion assessment method for the intensive care unit. *Crit Care Nurse*, 23 (2):25-36; quiz 37-28.
- Ulvestad E, Williams K, Bo L, Trapp B, Antel J, Mork S. 1994. HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology*, 82 (4):535-541.
- van Gool WA, van de Beek D, Eikelenboom P. 2010. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. *Lancet*, 375 (9716):773-775.
- Vincent JL, Ferreira F, Moreno R. 2000. Scoring systems for assessing organ dysfunction and survival. *Crit Care Clin*, 16 (2):353-366.
- Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. 2013. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 13 (5):426-435.
- Warnke RA, Pulford KA, Pallesen G, Ralfkiaer E, Brown DC, Gatter KC, Mason DY. 1989. Diagnosis of myelomonocytic and macrophage neoplasms in routinely processed tissue biopsies with monoclonal antibody KP1. *Am J Pathol*, 135 (6):1089-1095.
- Weigand MA, Horner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. 2004. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18 (3):455-475.
- Weiss LM, Arber DA, Chang KL. 1994. CD68: a review *Appl Immunohistochem*.
- Werdan K, Schuster H-P. 2005. Sepsis und MODS. 4 Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Wood PL. 1995. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol Res*, 17 (4):242-248.
- Young GB, Bolton CF, Archibald YM, Austin TW, Wells GA. 1992. The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol*, 9 (1):145-152.
- Zauner C, Gendo A, Kramer L, Funk GC, Bauer E, Schenk P, Ratheiser K, Madl C. 2002. Impaired subcortical and cortical sensory evoked potential pathways in septic patients. *Crit Care Med*, 30 (5):1136-1139.
- Zhang Z, Zhang ZY, Wu Y, Schluesener HJ. 2012. Lesional accumulation of CD163+ macrophages/microglia in rat traumatic brain injury. *Brain Res*, 1461:102-110.
- Zotova E, Holmes C, Johnston D, Neal JW, Nicoll JA, Boche D. 2011. Microglial alterations in human Alzheimer's disease following Abeta42 immunization. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37 (5):513-524.
- Zwadlo G, Voegeli R, Schulze Osthoff K, Sorg C. 1987. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol*, 55 (6):295-304.

9 Anhang

9.1 Ergänzungen

Tabelle 23: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz-Kriterien

I. Nachweis der Infektion

- Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

II. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) (mind. 2 Kriterien)

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$): Rektale oder intravasale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}$)
- Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

III: Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa} (\leq 75 \text{ mmHg})$ unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 33 \text{ kPa} (\leq 250 \text{ mmHg})$ unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2 \times$ oberhalb des Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5 \times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Sepsis: Kriterien I und II

Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III

Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90 \text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $= 65 \text{ mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Mikrotomie	25
Tabelle 2: Geräte und Chemikalien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die immunhistochemischen Färbungen und Mikroskopie	25
Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen	26
Tabelle 5: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	26
Tabelle 6: Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.....	28
Tabelle 7: Färbeprotokoll der Immunhistochemie	31
Tabelle 8: Regionen der Medulla oblongata	33
Tabelle 9: Demographische Übersicht über Mikroglia- und Kontrollgruppe	36
Tabelle 10: Übersicht über Begleiterkrankungen.....	36
Tabelle 11: Mikrogliaknötchen und klinischer Verdacht auf Sepsis	37
Tabelle 12: Mikrogliaknötchen und autoptischer Verdacht auf Sepsis.....	38
Tabelle 13: Klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis.....	39
Tabelle 14: Übereinstimmung von klinischen, autoptischen und neuropathologischen Befunden bezüglich Sepsis.....	40
Tabelle 15: Auftreten von Mikrogliaknötchen bei initialer Routine-Diagnostik und bei Kontrolluntersuchung auf tieferen Schnittstufen	42
Tabelle 16: Immunhistochemische Detektion von Mikrogliaknötchen im Vergleich zur initialen Routine-Diagnostik	44
Tabelle 17: Patientenkollektiv mit klinischem Verdacht auf Sepsis.....	48
Tabelle 18: Patientenkollektiv mit autoptischem Verdacht auf Sepsis	49
Tabelle 19: Patientenkollektiv mit klinischem, autoptischem und neuropathologischem Verdacht auf Sepsis	50
Tabelle 20: Durchschnittliche Zelldichte ramifizierter und amoeboider Mikroglia in HLA- und CD68-Färbung	52
Tabelle 21: Gruppeneinteilung nach Alzheimer und Sepsis	64
Tabelle 22: Gruppeneinteilung nach Ischämie und Sepsis.....	66
Tabelle 23: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz-Kriterien	92

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze der Medulla oblongata.....	33
Abbildung 2: Histologisches Bild der Medulla oblongata, HLA.....	33
Abbildung 3: Festlegung der „area of interest“ für Abbildung 2.....	33
Abbildung 4: Cell Counting, ImageJ.....	34
Abbildung 5: Hirnregionen mit Mikrogliaknötchen in der HE-Färbung.....	35
Abbildung 6: Mikrogliaknötchen und klinischer Verdacht auf Sepsis.....	37
Abbildung 7: Mikrogliaknötchen und autoptischer Verdacht auf Sepsis.....	38
Abbildung 8: Klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis.....	39
Abbildung 9: Mikrogliaknötchen, klinischer und autoptischer Verdacht auf Sepsis.....	40
Abbildung 10: Übereinstimmung von klinischen, autoptischen und neuropathologischen Befunden bezüglich Sepsis.....	41
Abbildung 11: Mikrogliaknötchen (), HE.....	41
Abbildung 12: Vergleich der Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in der HE-Färbung.....	43
Abbildung 13: Mikrogliaknötchen, CD68.....	44
Abbildung 14: Mikrogliaknötchen, HLA.....	44
Abbildung 15: Vergleich der Anzahl an Mikrogliaknötchen zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in der HLA-Färbung.....	45
Abbildung 16: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Mikrogliaknötchen pro Patient in Mikroglia- und Kontrollgruppe zwischen HE- und HLA- Färbung.....	45
Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl an Mikrogliaknötchen pro Patient und untersuchter Region innerhalb der Medulla oblongata bei Mikroglia- und Kontrollgruppe.....	46
Abbildung 18: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe in HLA- und CD68-Färbung.....	47
Abbildung 19: Kontrollgruppe, CD68.....	47
Abbildung 20: Mikroglia-Gruppe, CD68.....	47
Abbildung 21: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA.....	48
Abbildung 22: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68.....	48
Abbildung 23: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen klinischer Sepsis- und Kontrollgruppe, HLA.....	49
Abbildung 24: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen klinischer Sepsis- und Kontrollgruppe, CD68.....	49
Abbildung 25: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen autoptischer Sepsis- und Kontrollgruppe, HLA.....	50
Abbildung 26: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen autoptischer Sepsis- und Kontrollgruppe, CD68.....	50
Abbildung 27: Vergleich der Mikrogliaadichte zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe, HLA.....	51

Abbildung 28: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe, CD68	51
Abbildung 29: Ramifizierte Mikroglia, CD68	51
Abbildung 30: Ramifizierte Mikroglia, HLA	51
Abbildung 31: Amoeboide Mikroglia, CD68	52
Abbildung 32: Amoeboide Mikroglia, HLA	52
Abbildung 33: Zelldichte amoeboider und ramifizierter Mikroglia, HLA	53
Abbildung 34: Zelldichte amoeboider und ramifizierter Mikroglia, CD68	53
Abbildung 35: Vergleich der Zelldichten ramifizierter Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA	53
Abbildung 36: Vergleich der Zelldichten ramifizierter Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68	53
Abbildung 37: Vergleich der Zelldichten amoeboider Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA	54
Abbildung 38: Vergleich der Zelldichten amoeboider Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68	54
Abbildung 39: Vergleich des Quotienten aus amoeboiden und ramifizierten Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA	55
Abbildung 40: Vergleich des Quotienten aus amoeboiden und ramifizierten Mikroglia zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68	55
Abbildung 41: Tractus solitarius, CD68	55
Abbildung 42: Tractus solitarius, HLA	55
Abbildung 43: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den einzelnen Regionen der Medulla oblongata, HLA	56
Abbildung 44: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den einzelnen Regionen der Medulla oblongata, CD68	56
Abbildung 45: Tractus solitarius, Kontrollgruppe, CD68	57
Abbildung 46: Tractus solitarius, Mikroglia-Gruppe, CD68	57
Abbildung 47: Vergleich der Mikroglia-dichte im Tractus solitarius zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA	57
Abbildung 48: Vergleich der Mikroglia-dichte im Tractus solitarius zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68	57
Abbildung 49: Vergleich der Zelldichte ramifizierter Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA	58
Abbildung 50: Vergleich der Zelldichte ramifizierter Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68	58
Abbildung 51: Vergleich der Zelldichte amoeboider Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, HLA	59
Abbildung 52: Vergleich der Zelldichte amoeboider Mikroglia der Olive zwischen Mikroglia- und Kontrollgruppe, CD68	59
Abbildung 53: Korrelation der Mikroglia-dichte zwischen dem Tractus solitarius und der Rautengrube, CD68	60
Abbildung 54: Korrelation der Mikroglia-dichte zwischen ramifizierten und amoeboiden Mikroglia, CD68	60

Abbildung 55: Altersverteilung, Mikroglia-Gruppe (n=31)	61
Abbildung 56: Altersverteilung, Kontrollgruppe (n=55)	61
Abbildung 57: Korrelation zwischen Mikroglia-dichte und Alter in der Mikroglia-Gruppe, CD68.....	62
Abbildung 58: Korrelation zwischen Mikroglia-dichte des Tractus solitarius und Alter in der Mikroglia-Gruppe, HLA.....	62
Abbildung 59: Geschlechterverteilung der Mikroglia- und Kontrollgruppe	62
Abbildung 60: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen Männern und Frauen, HLA	63
Abbildung 61: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen Männern und Frauen, CD68	63
Abbildung 62: Übersicht über die zerebralen Begleiterkrankungen des Patientenkollektivs.....	64
Abbildung 63: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen, HLA	65
Abbildung 64: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen, CD68.....	65
Abbildung 65: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen, HLA	67
Abbildung 66: Vergleich der Mikroglia-dichte zwischen den Gruppen, CD68.....	67

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn PD Dr. Bernd Romeike für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, an welchem ich in seiner Arbeitsgruppe tätig sein durfte. Ich danke ihm außerdem für die stets freundliche Unterstützung, seine kritischen Ratschläge und seine unendliche Geduld.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Iver Petersen danken, der die Realisierung der Arbeit am Institut für Pathologie grundlegend ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Daniela Haase für die engagierte Betreuung und Unterstützung im Labor. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, hatte immer ein offenes Ohr und verstand es, mich in den richtigen Momenten zu motivieren und mir Mut zu machen.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der FSU Jena, die mir bei der Beantwortung von Fragen und der Lösung von Problemen eine große Hilfe waren.

Bei Benjamin Giszas, Mike Stubenrauch, Sven Gorski und Thomas Hofmann möchte ich mich herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen und die hilfreichen Anmerkungen bedanken.

Ein großer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und Freunden, die mich während meiner gesamten Promotionsphase liebevoll unterstützt und motiviert haben.

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Krämer
Vorname: Renata
Anschrift: Triniusstraße 9
98693 Ilmenau
Geburtsdatum: 02.02.1990
Geburtsort: Ilmenau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Telefon: +49162 / 1549422
E-Mail: renata.kraemer90@gmail.com

Schulbildung:

1996- 2000 Staatliche Grundschule Karl-Zink, Ilmenau
2000- 2009 Staatliches Gymnasium Goetheschule Ilmenau mit
Besuch der mathematisch-naturwissenschaftlichen
Spezialklasse, Abschluss: Abitur (Note: 1,0)

Studium:

seit 10/09 Medizinstudium an der FSU Jena
09/11 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der
Note - sehr gut (1,0) - abgeschlossen
10/14 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der
Note - gut (2,0) – abgeschlossen

Promotion:

seit 08/2012 Dissertation am Institut für Pathologie der Friedrich-
Schiller-Universität Jena

Praktika:

04/06 Praktikum in der Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe, Ilm-Kreis-Kliniken
06/09-07/09 Krankenpflegedienst
Station 25- Innere Medizin II, Ilm-Kreis-Kliniken

08/09-09/09	Krankenpflegedienst Station 21- Chirurgie, Ilm-Kreis-Kliniken
05/10	Praktikum Amtsärztlicher Bereich, Gesundheitsamt Ilm-Kreis
07/10-08/10	Krankenpflegedienst Station 25- Innere Medizin II, Ilm-Kreis-Kliniken
08/12-09/12	Famulatur am Institut für Pathologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
02/13-03/13	Famulatur Anästhesiologie und Intensivmedizin, Ilm-Kreis-Kliniken
09/13-10/13	Famulatur Allgemeinmedizin, Landarztpraxis Dr. Ullrich Großbreitenbach
02/14-03/14	Famulatur Palliativmedizin und Chirurgie, Ilm-Kreis-Kliniken
01/15	Praktikum am Institut für Rechtsmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Auslandsaufenthalte:

04/03	Sprachreise nach Swansea (Wales)
07/06- 06/07	EF High School Year in Hobart, Tasma (Australien)

Fremdsprachenkenntnisse:

Englisch (fließend in Wort und Schrift)
Latein (Kleines Latinum)

Auszeichnungen:

03/06	Landessieger „Jugend forscht“ Thüringen
05/06	Teilnahme am Bundeswettbewerb „Jugend forscht“

Interessen/ Hobbys:

Sport	Mitglied im Judoverein des PFC Ilmenau e.V. 90
Musik	Violine, langjähriges Mitglied des Jugend- und Musikschulorchesters „Capella Juventa“ in Ilmenau, Schulchor, Vokalquartett der Musikschule Ilmenau

Jena, den 12.06.2015

Unterschrift des Verfassers

9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Bernd Romeike

Dr. Daniela Haase

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers